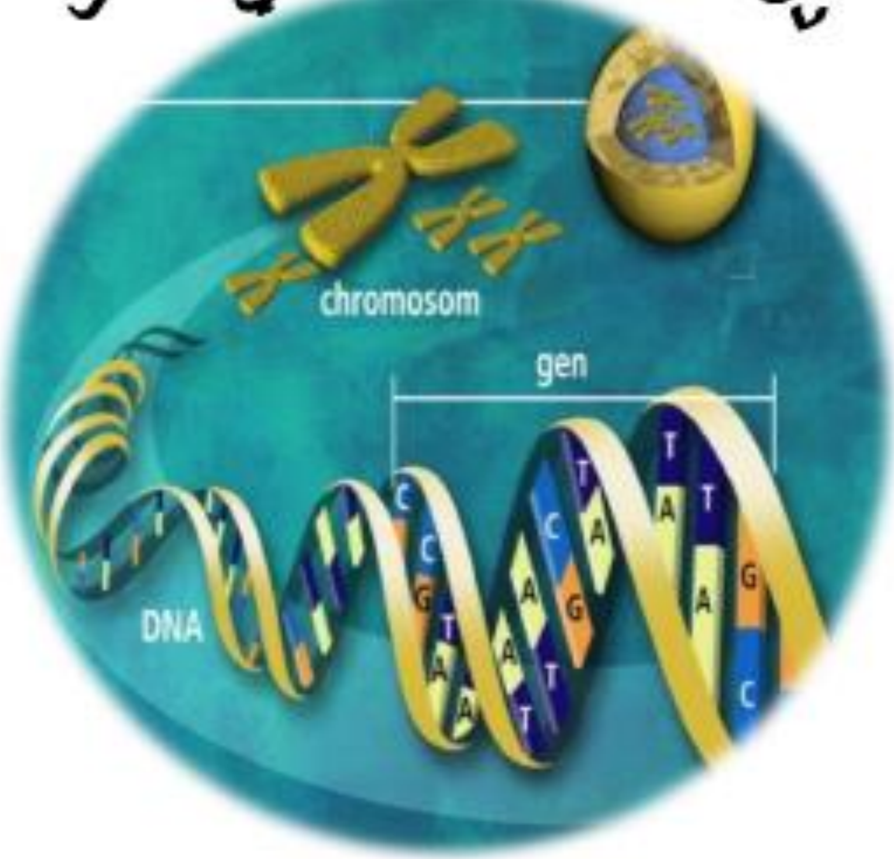
جامعة الموصل

كلية التربية

دورة تدريبية في مبادئ تقانات البايولوجي الجزئي



قسم علوم الحياة

مختبر بحوث الوراثة الجزيئية للكائنات الحية

إعداد

د. خالد دحام احمد

د. محمد عبدالاله الشكرجي　　　　د. بلقيس يحيى نجم

المحتويات

الأحماض النووية

المقدمة :

الأحماض النووية هي عبارة عن جزيئات جسيمة توجد في جميع الخلايا الحية في صورة طليقة أو متحدة مع البروتين وبدأ العلماء أبحاثهم على الأحماض النووية منذ حوالي مائة عام مضت حين استطاعوا فصلها من أنوية الخلايا. الأحماض النووية توجد في كل الخلايا الحية حيث أنها ليست فقط مسؤولة عن حمل وانتقال التعليمات الجينية (الصفات الوراثية) ولكنها تتحكم أيضاً في ترجمة هذه التعليمات عند تكوين البروتينات المختلفة بالخلايا وذلك بتحكمها في ترتيب وتتابع الأحماض الأمينية لكل بروتين يتكون بكل خلية والأحماض النووية لها وزن جزيئي مرتفع وهي عبارة عن نيوكلتيدات (متعدد نيوكلتيدات) ومكوناتها الثلاث الرئيسية وهي : قاعدة نيتروجينية – وسكر خماسي – وحامض الفسفوريك .

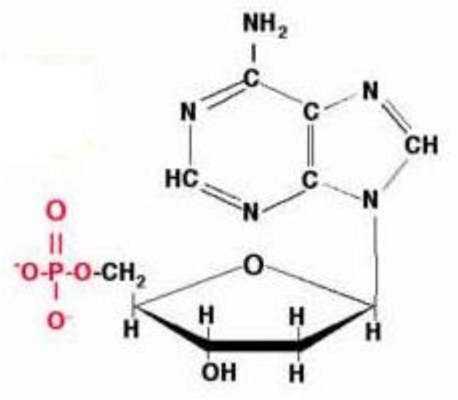
أنواع الأحماض النووية

يوجد نوعين من الأحماض النووية :

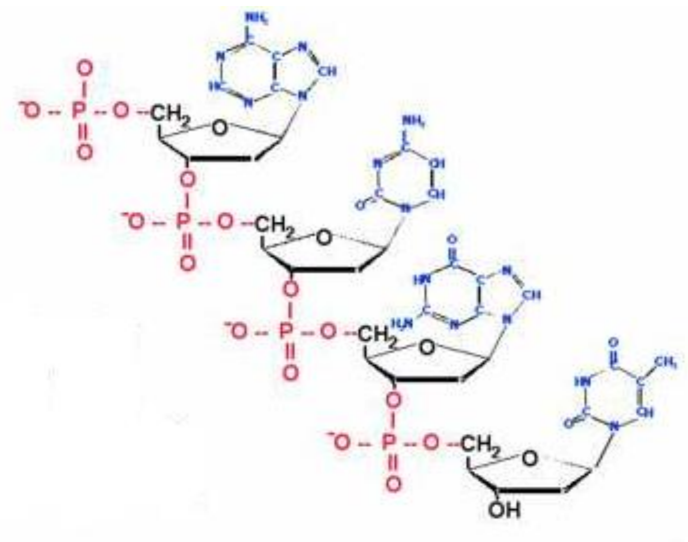
أ/ الحامض الرايبونيوكلتيدي Ribonucleic Acid (RNA)

ب/ الحامض الديؤكسي رايبونيوكلتيدي Deoxyribonucleic Acid (DNA)

يتكون البناء الأساسي لهذه الأحماض من سلاسل فيها جزيئات من حامض الفسفوريك وسكر بالتبادل ويتصل بكل جزيء من جزيئات السكر قاعدة نايتروجينية إما من نوع البيورين أو البيرميدين والسكر الموجود بجزيء الحامض الرايبونيوكلتيدي (RNA) هو سكر الرايبوز بينما في جزيء الحامض الديؤكسي رايبونيوكلتيدي (DNA) فهو سكر الديؤكسي رايبوز (منقوص الاوكسجين)....شكل (1) ، شكل (2)



شكل(1) الوحدة البنائية لــDNA (النيوكليوتيد منقوص الاوكسجين)



شكل (2) هيكل بناء احدى سلسلتي الــDNA

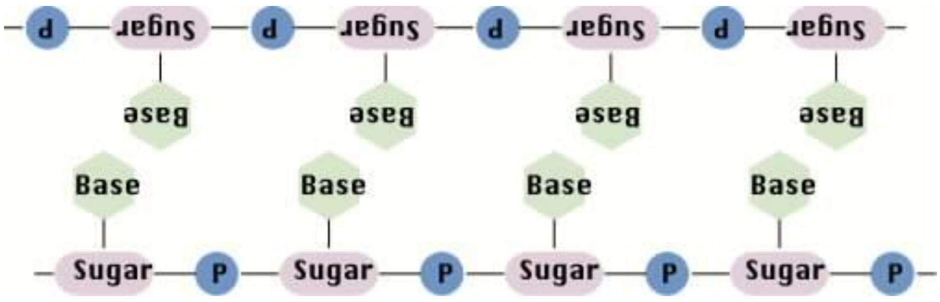
<u>مكونات الاحماض النووية :</u>

يتكون الحامض النووي من ثلاثة أنواع من المركبات:

- حامض الفسفوريك.
- سكر خماسي الكربون وهو سكر الرايبوز أو دي – أوكسي – رايبوز.

- وقواعد نيتروجينية تتبع البيورينات أو البيرميدينات شكل(3)

وسوف نتناول كل منهم بشيء من التفصيل...

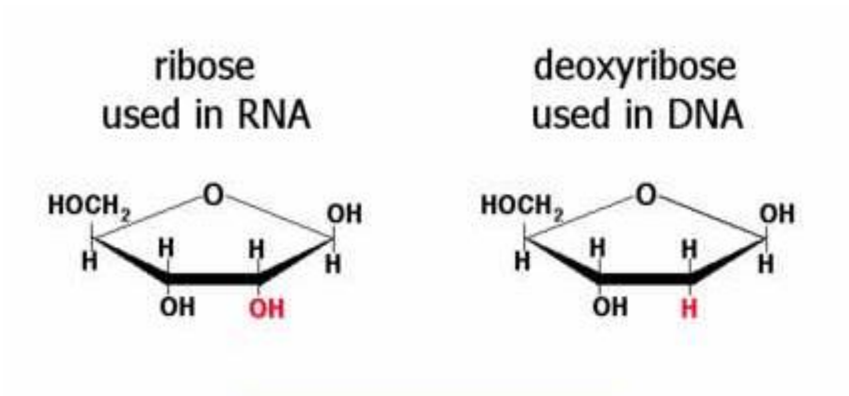


شكل(3) : بناء الاحماض النووية

السكر الخماسي

يوجد في الاحماض النووية نوعان من السكر الخماسي ، أحدهما هو D – رايبوز ويوجد في حامض (RNA) ، والثاني ديؤكسي رايبوز ويوجد في حامض (DNA) شكل (4). أعطيت ذرات كاربون السكر الخماسي الأرقام التالية 1´، 2´ ، 3´، 4´، 5´ لتمييزها عن الأرقام المعطاة لذرات الكربون والنيتروجين الموجودة في البيرميدين والبيورين. ومن الخصائص الهامة للسكر الخماسي هو قدرة المجاميع الهيدروكسيلية على تكوين إسترات مع حامض الفسفوريك وخاصة تلك المجاميع الموجودة على ذرة الكاربون الثالثة و الخامسة.

شكل (4) التركيب الكيمائي لسكر الرايبوز والديؤكسي رايبوز



البيورينات والبيرميدينات

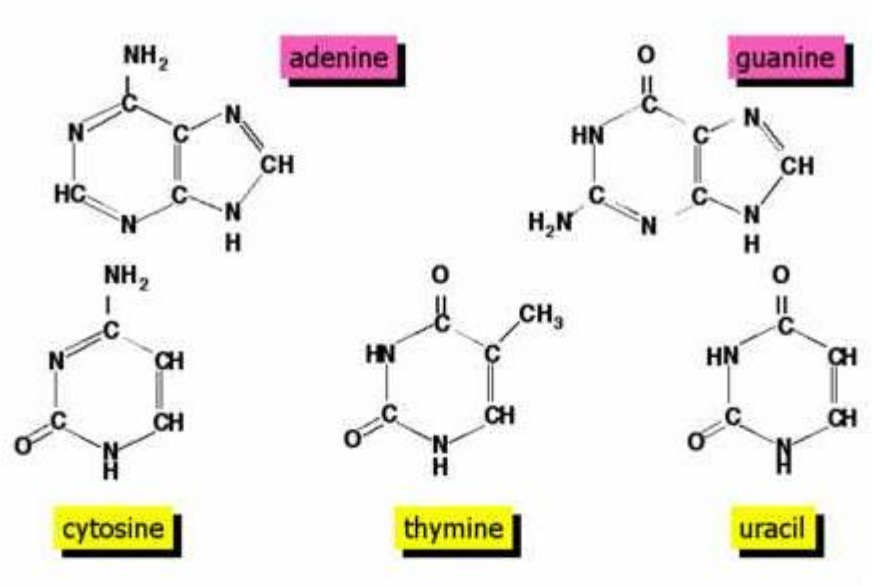
1/**قواعد بيورينية:** وتنتج من التحام حلقة إيميدازول الخماسية مع حلقة البيرميدين وأهم هذه القواعد.

- ☒ أدينين Adenine
- ☒ كوانين Guanine

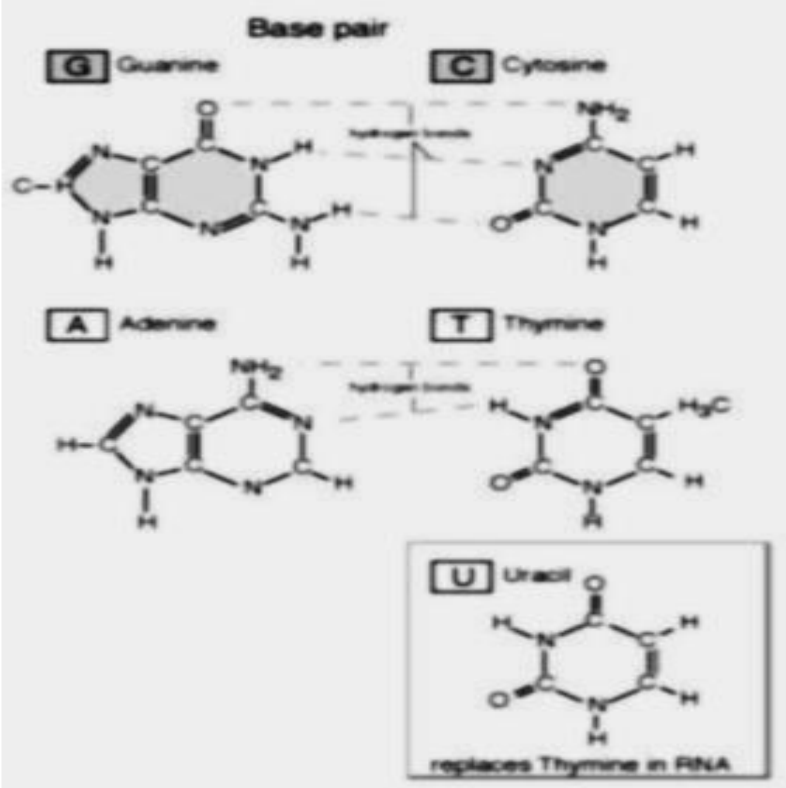
2/ **قواعد بيرميدينية:** وهذه القواعد مشتقة من البيرميدين بإستبدال ذرات الهيدروجين الموجودة على كربون رقم 2،4،5 بمجاميع أمينو أوهيدروكسيل أو ميثايل وأهم هذه القواعد.

- سايتوسين Cytosine
- يوراسيل Uracil
- ثايمين Thymine

ويحتوي كلاً من الحامضيين النوويين DNA و RNA على القاعدتين النايتروجينين من البيورين وهما الأدينين Adenine والكوانين Guanine ونجد أيضاً أن كلاً من الحامضيين النوويين DNA و RNA يحتوي على قاعدة نايتروجينية من نوع البيرميدين وهي سايتوسين Cytosine ولكنهما يختلفان في القاعدة النايتروجينية الثانية من نوع البيرميدين فبينما يحتوي الحامض النووي RNA على القاعدة النايتروجينية يوراسيل Uracil يحتوي الحامض النووي DNA على القاعدة النايتروجينية ثايمين Thymine شكل (5)



شكل (5): التركيب الكميائي للقواعد النيتروجينية (البيورينية والبيرميدينية)



مجموعة الفوسفات

تربط مجموعة الفوسفات بين مجموعات السكر الخماسية في سلاسل كل من الحامضين (DNA) و (RNA).

النيوكليوسيدات

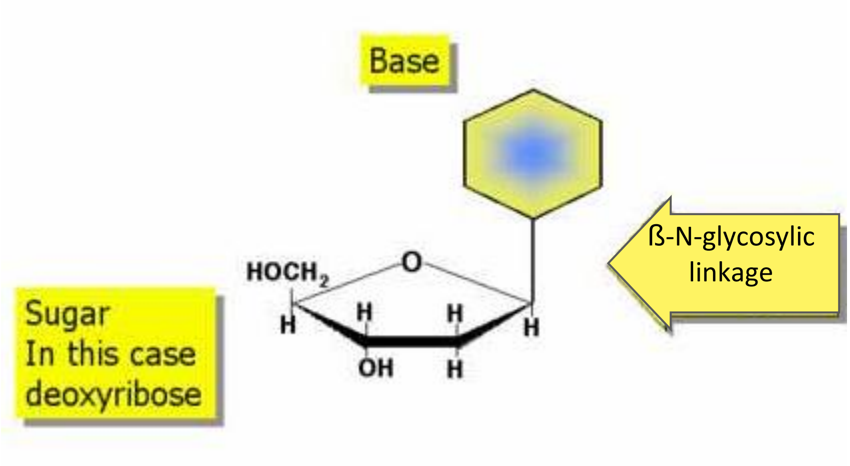
النيوكليوسيدات هي مركبات ناتجة من اتحاد أحد جزيئات القواعد النايتروجينية من نوع البيورين أو البيرميدين مع جزيئة السكر بيتا– رايبوز أو بيتا– ديؤكسي رايبوز برابطة كليوكسيدية (بيتا) ، يرتبط السكر مع ذرة النايتروجين رقم 9 في البيورينات وبين ذرة الكاربون رقم 1 في السكر مع ذرة النايتروجين رقم 3 في البريميدينات.

النيوكليتيدات

النيوكليتيدات هي إسترات حامض الفوسفوريك للنيوكلوسيدات عند اتحاد النيوكليوسيد مع مجموعة الفوسفات تتكون النيوكليوتيدة. ترتبط مجموعة الفوسفات مع السكر الموجود في النيوكليوسيدة في ذرة الكاربون رقم 3 او 5 للسكر وهذا الارتباط في الذرة 3 او 5 هو الذي يحدد قطب شريط الـــDNA 3^- و 5^-. ترتبط النيوكليوتيدات فيما بينها بأواصر فوسفاتية ثنائية الاستر Phosphodiester bonds بين ذرة الكاربون رقم 3 لسكر النيوكليوتيدة الاولى مع ذرة الكاربون رقم 5 لسكر النيوكليوتيدة الثانية أي تربط بين OH^{-3} لنيوكليوتيدة مع PO^{-4} شكل 6. هذا الارتباط غير المتناظر هو الذي يعطي القطبية لتوالي النيوكليوتيدات وبذلك ترتبط الاف النيوكليوتيدات مع بعضها. وهناك واحد من أهم النيوكليتيدات الموجودة طبيعياً وهو الأدوينوسين أحادي الفوسفات وهذا المركب (AMP) مع إثنين من مشتقاته وهما أدينوسين ثنائي الفوسفات (ADP) وأدينوسين ثلاثي الفوسفات (ATP) يلعب دوراً هاماً في

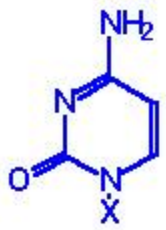
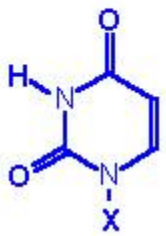
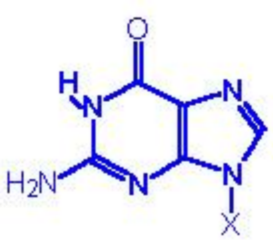
حفظ الطاقة وفي الإستفادة من الطاقة المنطلقة خلال عمليات التمثيل الغذائي بالخلايا والأهمية الفسيولوجية لهذه المركبات تكمن في قدرتها على إعطاء وإكتساب مجموعات فوسفاتية في التفاعلات البيوكيميائية. وتسمى النيوكليوسيدات والنيوكليتيدات تبعاً للقاعدة النيتروجينية الموجودة بها.

وهنـــاك عـــدة أنظمـــة للتســـمية موضحـــة في الجدول (1).



شكل (6) : ديوكسي النيوكليوتيد

جدول (1) نظام التسمية للنيوكليوسيدات والنيوكليتيدات

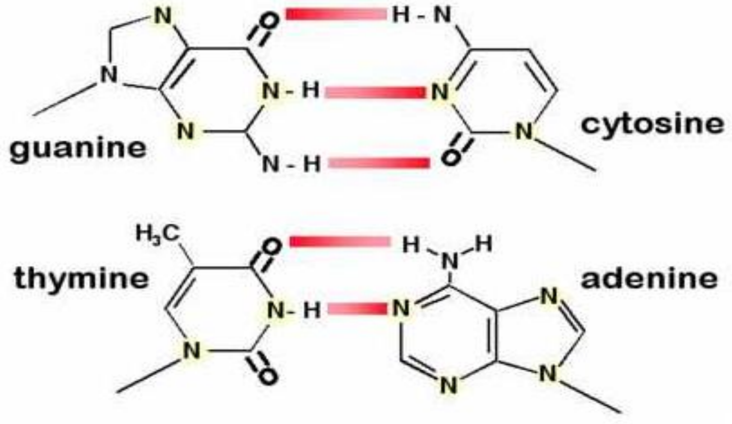
Base Formula	Base (X=H)	Nucleoside X=ribose or deoxyribose	Nucleotide X=ribose phosphate
	Cytosine, C	Cytidine, A	Cytidine monophosphate CMP
	Uracil, U	Uridine, U	Uridine monophosphate UMP
	Thymine, T	Thymidine, T	Thymidine monophosphate TMP
	Adenine, A	Adenosine, A	Adenosine monophosphate AMP
	Guanine, G	Guanosine, A	Guanosine monophosphate GMP

خواص الأحماض النووية

تمتص القواعد النايتروجينية من نوع البيورين والبيرميدين الموجودة في الأحماض النووية الأشعة الفوق بنفسجية بدرجة كبيرة عند الطول الموجي 260 نانوميتر (260 nm). تستخدم هذه الخاصية لتقدير هذه القواعد النايتروجينية كمياً وأيضاً الأحماض النووية الداخلة بتركيبها.

وعند تسخين الحامض النووي DNA المبلمر بدرجة كبيرة ببطء فان السلسلتين حلزونيتي الشكل به تبتعدان عن بعضهما وتسمى عملية الابتعاد هذه بعملية انفصال او تشتيت السلسلتين (Melting). وهذا التحول من الشكل الحلزوني ذو السلسلتين الى أي شكل عشوائي يحدث خلال رفع درجة الحرارة عدداً قليلاً من الدرجات ونتيجة لهذا التحول تزداد درجة الامتصاص النوعي وتسمى درجة الحرارة التي يحدث عندها الزيادة المفاجئة في الامتصاص للأشعة فوق البنفسجية بدرجة حرارة الانفصال (Melting temperature Tm) للحامض النووي . ولكل نوع من انواع الحامض النووي DNA درجة Tm خاصة به . أما عند إعادة تبريد المحلول ببطء فانه يحدث اعادة لتكوين الشكل الحلزوني ذو السلستين مع امكانية حدوث تبادل بين السلاسل وتسمى هذه العملية Annealing .

يلاحظ أن السلسلتين المكونتين للشكل الحلزوني في الحامض النووي DNA متوازيتان ولكنهما معكوستان (Antiparallel) والقواعد النايتروجينية بهما مزدوجة (Paired) بنظام A مع T و G مع C وهذا التخصص في الازدواج يعتمد على الروابط الهيدروجينية بين القواعد النايتروجينية فنجد ثلاثة روابط هيدروجينية لكل زوج G - C ورابطتين هيدروجينيتين لكل زوج A – T . انظر شكل (8)

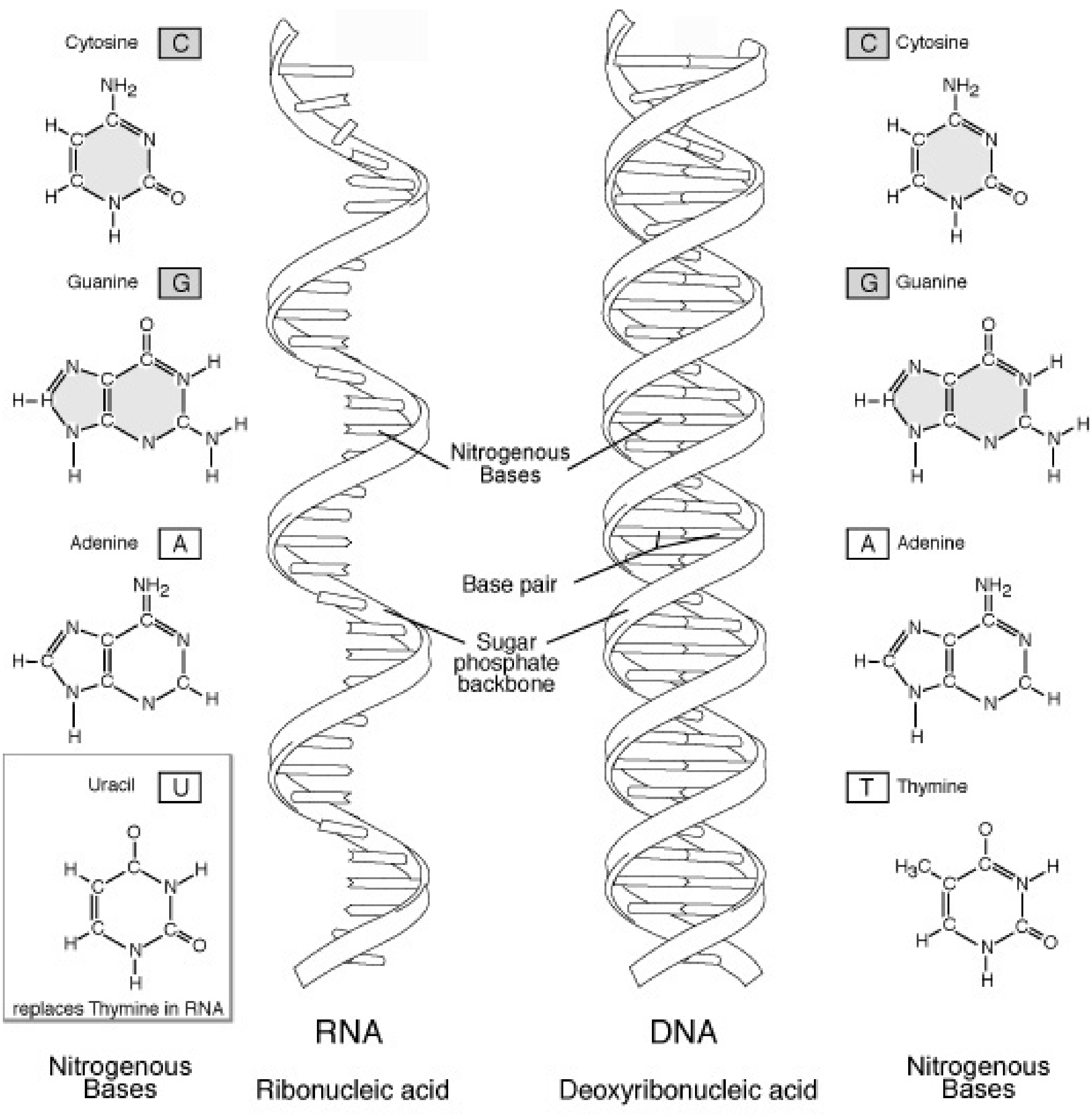


تركيب حامض الرايبو نيوكليك

يكون الـــ (RNA) بين 5–10% من الوزن الكلي للخلية وهناك 3 أنواع رئيسية من هذا الحامض النووي :

- RNA الرسول (Messenger RNA).
- RNA الرايبوسومي (Ribosomal RNA).
- RNA الناقل (Transfer RNA).

ولكل نوع من الأنواع الثلاثة وزن جزيئـــي وتركيـــب خـــاص بـــه مـــن القواعـــد النيتروجينية. ويحتوي كلاً من الحامضـــيين النـــوويين DNA و RNA علـــى القاعـــدتين النايتروجيتين من مجموعة البيورين وهما الأدينين Adenine والكوانين Guanine ونجـــد أيضاً أن كلاً من الحامضيين النوويين DNA و RNA يحتوي على قاعدة نايتروجينية مـــن نوع البيرميدين وهي سايتوسين Cytosine ولكنهما يختلفان في القاعدة النايتروجينية الثانية من نوع البيرميدين فبينما يحتوي الحامض النووي RNA على القاعدة النايتروجينية يوراسيل Uracil يحتوي الحامض النووي DNA على القاعدة النايتروجينية ثايمين Thymine شكل (9).



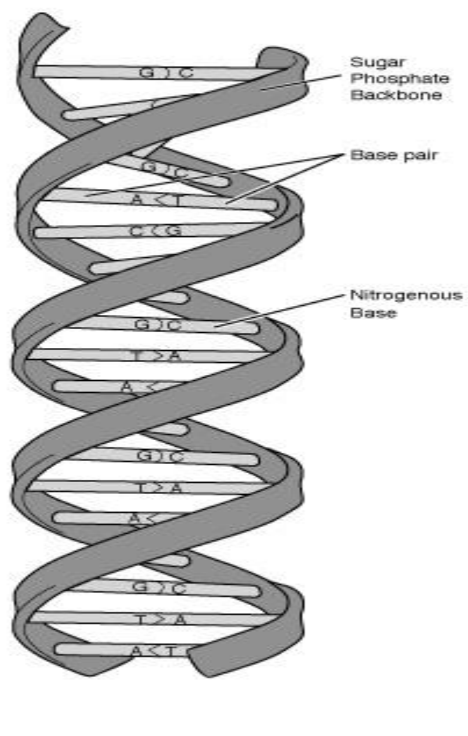
شكل(9): الفرق بين الحمض النووي DNA وRNA

تركيب الحامض النووي الدؤكسي رايبوز

لاحظ العالم تشارجاف Chargaff أن نسبة الادنين الى الثايمين تقارب 1 وأيضاً نسبة السايتوسين إلى الكوانين تقارب إلى حد كبير 1 في جزيء الحامض النووي DNA وان هذه النسبة لها أهمية كبيره في ايجاد تركيب هذا الحامض. ولقد وجد بعد ذلك ان نيوكليتيدات الادنين والثايمين يمكن أن تزدوج بواسطة رابطتين هيدروجينيتين بينما السايتوسين والكوانين يمكن ان ينظما بالنسبة لبعضهما بوضع خاص في جزيء الحامض النووي يسمح بتكوين ثلاثة روابط هيدروجينية بينهما.

ولقد لاحظ العالم ولكنز Wilkins بإنكلترا انه باستخدام اشـعة اكـس ان الحـامض النووي DNA المستخلص من مصادر مختلفة متماثل الى حد كبير . ومـن خـلال نتائجـه ونتائج العالم تشار جاف اقترح أن جزيء الحامض النووي DNA يتكون من اثنين أو أكثـر من السلاسل البولي نيوكليوتيدية منظمة على شكل حلزوني وأن السلاسل البولي النيوكليوتيدية الطويلة تمسك معاً خلال روابط هيدروجينية بين القواعد النايتروجينية .

وفي عام 1953م وضع العالمان واتسـون وكريـك Watson & Crick تصـميماً لجزيء الحامض النووي DNA شكل (10) واقترح العالمان واتسون وكريك انه يتكون من سلسلتين متعدد النيوكليوتيد ملتفتين حلزونياً (باتجاه اليد اليمنى) تشكل فيه وحدات السـكر ومجموعات الفوسفات الجزء الخارجي للحلزون في حين تبرز القواعـد النايتروجينيـة الـى الداخل من العمود الفقري. تكون السلسلتين في جزيئة الـ DNA مكملتان لبعضهما الـبعض فعند معرفة تسلسل القواعد النايتروجينية لأحدى السلسلتين يمكننا معرفة تسلسل القواعد فـي السلسلة الاخرى. مثال:- لو كان تسلسل القواعد في السلسلة الاولى ATGCTT فان التسلسل في السلسلة الثانية يكون TACGAA.



شكل (10) : الشكل الحلزوني ذو السلسلتين للحمض النووي DNA

وقد وجد ان نسبة T+A اعلى من نسبة C+G في الحيوانات والنباتات الراقية، حين لوحظت اختلافات كبيرة في هذه النسب في البكتريا والفايروسات والنباتات الواطئة، وهذه النسبة بـين القواعد تكون ذات اهمية كبيرة في التشخيص اذ تكون النسبة متشابهة في الكائنـات القريبـة

تصنيفيا من بعضها. ونتيجة الدراسات العديدة على الأحماض النووية في الأنسجة المختلفة وفي الكائنات الحية المتنوعة اتضح أن كمية DNA الموجودة في نويات الأنسجة المختلفة بأي كائن حي تكون ثابتة ولكنها تختلف من كائن لآخر ، ولم يلاحظ استثناء في هذه القاعدة إلا في لخلايا الجنسية التي تكون احادية المجموعة الكروموسومية وفي هذه الحالة نجد أن كمية DNA الموجودة بها تكون نصف الكمية الموجودة بالخلايا الجسمية ، وفي الخلايا المتعددة الكروموسومات نجد أن كمية DNA تزداد تبعاً لتضاعف العدد الكروموسومي.

<u>استخلاص الاحماض النووية:</u>

التحليلات العملية في علوم التكنلوجيا الحيوية والهندسة الجينية يتم تطبيقها على الحامض النووي DNA وهي المادة الموجودة في الخلية الحية والتي تتحكم بعملية نمو وتغير خصائص الكائنات الحية (نبات-انسان- حيوان- كائنات دقيقة). تختلف صور واماكن تواجد الـــDNA في الكائنات وذلك حسب نوع الكائن كما يلي:

<u>اولا: الكائنات بدائية النواة:</u>

يوجد الـــ DNA في الكائنات بدائية النواة مثل البكتريا عادة في السايتوبلازم الخلية في صورة DNA حلقي الشكل حيث تتميز تلك الكائنات بعدم وجود غشاء نووي يحيط بالنواة ويحددها ويسمى جزء الـــ DNA الخاص بالبكتريا بالكروموسوم البكتيري او الـــDNA البكتيري ، ومن المعروف ان الكائنات البدائية النواة مثل البكتريا تتميز بوجود جزيئات الـــDNA صغيرة حلقية مستقلة عن الـــDNA البكتيري تسمى بالبلازميدات.

<u>ثانيا: الكائنات حقيقة النواة:</u>

تمتاز بوجد الـــDNA في عضيات خاصة اهمها:

<u>النواة:</u>

وهي تحتوي على معظم الـــDNA الخلوي الذي يعتبر المادة الوراثية الرئيسية في الخلية ويسمى بالـــ <u>nDNA nuclear DNA or genomic DNA</u> وهو يوجد مغلف بأغلفة بروتينية بصورة كروموسومات يختلف عددها على حسب النوع، وينتقل عن طريق الاب والام معا.

<u>المايتوكوندريا:</u>

وهي تحتوي على كمية صغيرة من الـــDNA وعادة تحتوي على جينات خاصة بأنزيمات الطاقة ويسمى mtDNA ويتوارث عن طريق الام فقط.

البلاستيدات:

تحتوي على كمية صغيرة من الـــDNA يحتوي على الجينات الخاصة بأنزيمات البناء الضوئي ويسمى cpDNA (chloroplast) .

اهمية استخلاص الـــDNA:

الحصول على الـــDNA بصورة نقية لاستخدامه في التطبيقات المختلفة مثل:

- تضخيم قطع الـــ DNA في تفاعل المتبلمر المتسلسل.
- تحديد القواعد النايتروجينية.
- البصمة الوراثية.
- رسم الخارطة الوراثية.
- التحولات الوراثية.
- توصيف المحتوى البلازميدي والكروموسومي.

الخطوات العامة لعزل الـــDNA

ان عملية استخلاص الـــ DNA من الخلايا أيا كان مصدر الاستخلاص (بكتريا، الخميرة ، طحالب، خلايا حقيقة النواة، خلايا نباتية وحيوانية) تتضمن مجموعة من الخطوات الاساسية، ويمكن تلخيصها بصورة عامة بالنقاط الاتية:

1- تحليل الخلايا (Cell lysis)

تتضمن عملية تحليل جدار الخلايا عادة في بدائية النواة باستخدام :

- انزيم lysozyme حيث يعمل هذا الانزيم على تفكيك الاصرة ß(1-4) التي تربط N-acetylmuramic acid , N-acetyl-D-glucosamine في جدار الخلية البكتيرية حيث يوجد هذا الانزيم في اللعاب وفي الدموع وحليب الام وايضا يوجد في بياض البيض فله دور فعال في تحليل جدران الخلايا البكتيرية .
- انزيم lyticase او zymolyase لتحليل جدار الخمائر.
- انزيم cellulase و pectinase لتحليل جدار الخلايا النباتية.
- انزيم pectinase لتحليل جدار الخلايا في الحشرات.
- استخدام الخرزات الزجاجية لتكسير جدران الخلايا.
- استخدام النايتروجين السائل حيث يوفر درجة حرارة تقترب من −190 م° مما يؤدي الى تهشم الانسجة مثل الزجاج وأيضا تعمل على تثبيط انزيمات النيوكليز في درجات الحرارة المنخفضة ويحافظ على الـــDNA من التحطم .

- ممكن في بعض الاحيان استخدام Buffer lysis في تحليل جدران الخلايا او بفر منظم حيث يحتوي على مثبطات الانزيم الــDNAase الذي يقوم بتكسير خيوط الــDNA مثال EDTA او مادة SDS والتي تثبط نشاط انزيم الــDNAase.

2- الحلالة الخلوية **Cell lysates**

لعزل الــ DNA من الحلالة الخلوية نضع الكلوروفوم او فينول :كلوروفوم: الكحول الايزواميلي.

3- الخطوة الاخرى رجة بسيطة تقلب الانابيب مرة واحدة بالنسبة لكائنات بدائية النواة اما كائنات حقيقة النواة تقلب الانابيب ما يقارب عن عشر مرات .

4- اجراء الطرد المركزي فنحصل على طبقتين طبقة مائية وطبقة عضوية وبينها طبقة بروتينية بيضاء .

5- نسحب الطبقة المائية حيث ان هذه الطبقة حاوية على الــ DNA الذائب .

6- ترسيب الــDNA

- عشر الكمية من 3 مولاري صوديوم استيت + ضعف الحجم الكحول المطلق لمدة نصف ساعة في ظروف التبريد.
- اما باستخدام الكحول المطلق ترسيب سريع لمدة ساعتين.
- ايزوبروبانول لمدة 24 ساعة.

7- غسل الــ DNA

تكون جزيئة الــDNA المترسبة محملة بالاملاح الاسيتيت لذلك تغسل بالكحول 70%

يتم عملية الغسل بإضافة 5 مل من الكحول 70% وتترك لمدة خمس دقائق في درجة حرارة المختبر وتطرد مركزيا.

8- تجفيف الــDNA يتم عملية التجفيف بالهواء الى ان تتطاير منها الكحول.

9- اذابة الــ DNA اما في الماء المقطر او **TE buffer** يفضل عملية تعليق الــ DNA بالبفر TE buffer.

10-للتخلص من الــ RNA فبالإمكان اضافة الــRNAase الذي يقوم بتحليل الحامض النووي الرايبوزي.

<u>فوائد اضافة كل مادة اثناء عملية عزل الــDNA</u>

Tris-base او **Tris-HCl** :- تساعد على توفير pH مناسب يعمل فيه الــ DNA.

EDTA :- يعمل عامل كلابي chelating agent عوامل مخلبية فائدتها تعمل على سحب ايونات Mg^+ او Ca^+ فتعمل على خلل في الاوزموزية وتفجير الخلايا.

وايضا سحب ايونات المغنسيوم من انزيم الــDNAase فيبطل عمل تحليل الــDNA.

Sucrose او **NaCl** :- يولد خلل في الضغط الاوزموزي.

SDS :- تعمل على تحطيم الدهون ومسخها من الاغشية.

Proteinase K: - يعمل على تحليل البروتينات.

ß- Mercaptoethanol: - تعمل كعامل مختزل في تفكيك الاواصر الببتيدية التي تربط الاحماض الامينية المكونة لجزيئات البروتين

Triton x-100 :- تحطيم الدهون.

CTAB:- تحطيم ومسخ الدهون ويعمل على سحب الاغشية الخلوية وايضا يرتبط مع الاحماض النووية مكونا معقدا من الـــ CTAB- DNA ويجعل الحامض النووي غير ذائب وايضا بإمكانها تذويب بروتين الهستون .

Isoamyl alcohol :- ازالة الرغوة الناتجة من استخدام الـــ SDS و CTAB.

Phenol:- التخلص من البروتينات.

Chloroform:- تذويب الدهون وفصل الاجزاء الخلوية عن الـــDNA ازالة البروتينات من الـــDNA ومسخ البروتينات وعلى عدم اذابة البروتينات الممسخة.

Isopropanol :- ترسيب الـــDNA كون شحنة الـــDNA سالبة والايثانول ايضا سالبة فالشحنات المتشابهة تتنافر من بعضها لذلك يترسب الـــDNA .

- لماذا يحفظ الـــ DNA في TE buffer؟
- كيف يعمل الكحول وصوديوم استيت على ترسيب الـــDNA؟
- لماذا يستخدم الكحول البارد في عملية ترسيب الـــ DNA؟

<u>خطوات عزل الـــDNA من انسجة حيوانية:</u>

مثلا لعزل الـــDNA من نسيج حيواني نتبع الخطوات التالية:-

1- يؤخذ نسيج حيواني وتوضع في الهاون الخزفي.

2- يوضع النيتروجين السائل في الهاون الخزفي الحاوي على النسيج الحيواني ثم تتبخر وتوضع كمية اخرى بنفس الحجم ويستمر الطحن لتلك الانسجة باستمرار حتى تتحول الى تراب رمادي powder.

3- يوضع هذا التراب بقدر نصف انبوبة ابندروف سعة واحد ونصف مل.

4- توضع في انبوبة الابندروف 1000 مايكرو ليتر من محلول منظم الاستخلاص ويضاف في بعض الاحيان خمسين مايكروليتر من بيتا-ميركابتوايثانول (Mercaptoethanol -ß) الذي يعمل على فك الاواصر الببتيدية ثم توضع الانابيب في حمام مائي على درجة حرارة 65 م° لمدة ساعة ويراعى التقليب في الحمام المائي وبعد استخراج الانابيب تترك لبضع دقائق حتى تصل لدرجة حرارة الغرفة.

5- يضاف الى الانبوبة حجم 1:1 كلوروفوم ثم ترج جيدا بخفة ولطف وهذا يعمل على ترسيب الاجزاء الخلوية وفصلها عن الـــDNA.
6- يعمل طرد مركزي 5000 دورة في الدقيقة لمدة 20 دقيقة ودرجة حرارة 4 م° وبعد انتهاء الطرد المركزي تظهر ثلاث طبقات: سفلى ووسطى وهي البقايا الخلوية غير المرغوب فيها والاخيرة رائقة العلوية.
7- يؤخذ الطبقة العلوية بحذر شديد ويوضع في انابيب ايبندروف جديدة وتكرر مرتين على الاقل.
8- يضاف الى الأنبوبة Cold isopropanol بنفس الحجم لترسيب الـــ DNA ثم ترج الانابيب بهدوء وتوضع في الفريزر -20 م° لمدة ساعة او على درجة 4 م° أي في الثلاجة طوال الليل.
9- يعمل طرد مركزي 10000 دورة لمدة 5 دقائق ودرجة حرارة 4 م°.
10- يزال الرائق أي ما يعلو الراسب ويترك الراسب pellet في قاع الانبوبة ثم يغسل الراسب بكحول اثيلي 70% ويرج بهدوء حتى يتحرر الـــDNA من قعر الانبوبة ثم يعمل طرد مركزي لمدة دقيقتين.
11- يزال الرائق ويترك الراسب في قاع الانبوبة لتجف او توضع تحت تفريغ Vaccum لتجف.
12- يتم اذابة الراسب في 500 مايكروليتر من TE buffer وتترك لمدة نصف ساعة على درجة 37 م°.
13- يضاف 4 مايكروليتر من انزيم الـــ RNAase بتركيز(1 ملغم/ مل) وتترك لمدة ربع ساعة على درجة 37 م° يراعى التقليب بين حين واخر.
14- يضاف الـــ proteinase K لهضم انزيم الـــ RNAase وتترك لمدة ربع ساعة على درجة 37 م° ويراعى التقليب بين حين واخر.
15- يضاف نفس الحجم كلوروفوم : ايزوامايل الكحول 1:24 ثم يرج برفق.
16- يعمل طرد مركزي 1000 دورة في الدقيقة لمدة 5 دقائق على حرارة 20 م° للتخلص من الـــproteinase k والـــ RNAase وباقي البروتينات فتتكون ثلاث طبقات.
17- يؤخذ الرائق الطبقة العليا بحذر شديد ويراعى عدم سحب الطبقة الوسطية (بقايا الخلايا والتأكد من ذلك جيدا).
18- يضاف الى الرائق 10/1 من حجمه خلات الصوديوم 3M صوديوم استيت ثم ضعف حجمه من الكحول الاثيلي (مطلق) وتوضع في الفريزر لمدة 45 دقيقة الى ساعة فيظهر الـــ DNA في صورة هالة قطنية وقد لا يظهر لقلة كميته.

19-يعمل طرد مركزي 8000 دورة لمدة 10 دقائق على درجة 4 م° فيظهر الــ DNA راسب ابيض Pellet.

20-يزال الرائق ويترك الراسب في القاع ويغسل بإيثانول 70% ثم يعمل طرد مركزي.

21- بعد استبعاد الكحول تجفف الــpellet جيدا يراعى التأكد من تمام التجفيف.

22-يضاف الى الراسب من 20 مايكروليتر الى 50 مايكروليتر من TE buffer ثم يحضن في درجة 37 م° لضمان اذابة الــDNA.

23- يحفظ هذا الــDNA المذاب في البفر في فريزر الثلاجة لحين الاستخدام.

بفر الاستخلاص:

1M Tris-base, pH 8.0, 0.025 M Na_2EDTA, 1.4M NaCl, 2% CTAB

يحضر بفر الاستخلاص من اذابة 12.14 غرام من Tris-base و 0.9306 غرام من EDTA و 8.19 غرام من NaCl و 2 غرام من CTAB في كمية من الماء المقطر ويضبط الاس الهايدروجيني الى 8 ويعقم ويبرد ويحفظ في الثلاجة.

<u>استخلاص الــ DNA من دم الانسان</u>

المحاليل:-

Tris-EDTA (TE buffer) 10 mM Tris-HCl, 1 mM Na_2EDTA, pH =8

TBS buffer (20 mM Tris – HCl, pH =8, 150 mM NaCl)

Lysis buffer A (10 mM Tris –base pH 8, 10 mM NaCl, 3 mM $MgCl_2$)

Lysis buffer B (400 mM Tris-HCl, 100 mM Na_2EDTA, pH= 8,1% SDS)

Proteinase K solution

Phenol

Isoamyl alcohol : Chloroform: (1:24)

Ammonium acetate

Absolute ethanol 95%

1- Tris-EDTA (TE buffer)

10 mM Tris-HCl, 1 mM Na_2EDTA, (pH =8)

يحضر من اذابة 0.2422 غرام من Tris-HCl مع 0.0744 غرام من Na_2EDTA ويضبط الــ الاس الهايدروجيني الى 8 ويكمل الحجم الى 100 مل باستخدام الماء المقطر ويعقم ويحفظ في ظروف 4 مئوية.

TBS buffer −2

mM Tris – HCl, pH =8, 150 mM NaCl)

يحضر من اذابة 0.1211 غرام من Tris – HCl, و 0.4383 غرام من NaCl في الماء المقطر المعقم ويضبط الاس الهايدروجيني الى 8 ويكمل الى 100 مل بالماء المقطر وتعقم وتحفظ في الثلاجة.

Lysis buffer A−3

(10 mM Tris –base pH 8, 10 mM NaCl, 3 mM $MgCl_2$)

يحضر من اذابة 0.12 غرام من Tris –base و 0.4 غرام من NaCl و 0.06 غرام من $MgCl_2$ في الماء المقطر ويضبط الاس الهايدروجيني الى 8 ويكمل بالماء المقطر الى 100 مل وثم تعقم وتحفظ في الثلاجة.

Lysis buffer B−4

(400 mM Tris-HCl, 100 mM Na2EDTA,pH= 8,1% SDS)

يحضر من اذابة 2.4228 غرام من Tris-HCl و 1.86 غرام من Na_2EDTA و 0.5 غرام من SDS ويضبط الاس الهايدروجيني الى 8 ويكمل بالماء المقطر الى 100 وتعقم وتحفظ في الثلاجة.

Proteinase K solution −5

يحضر من اذابة 10 ملغم من الانزيم في 1 مل من الماء المقطر المعقم.

Phenol-6

يوزن 200 غرام من الفينول وتذاب في حمام مائي بدرجة حرارة 68 م° ويضاف له 0.1 % من هيدروكسي كينولين ، ويستخلص الفينول الذائب بإضافة نفس الحجم من 0.5 مولاري من Tris الاس الهايدروجيني 8 نلاحظ يتكون طبقتين ونقوم بتضبيط الاس الهايدروجيني للطبقة العليا الى ان تصل الى حدود 7.8 وتكرر العملية عدة مرات ونسحب الطبقة العليا وبعدها تحفظ في الثلاجة.

Isoamyl alcohol : Chloroform: (1:24) −7

لتحضير 25 مل منه نأخذ 24 مل من الكلوروفوم و 1 مل من الكحول الايزواميلي.

Phenol: Chloroform (24:1) - 8

تحضر من مزج احجام متساوية من الفينول المشبع بالبفر مع نفس الحجم من Isoamyl alcohol : Chloroform: (1:24).

Ammonium acetate-9

يحضر 20 مل من امونيوم اسيتيت من اذابة 15.4 غرام من امونيوم استيت في الماء المقطر.

طريقة العمل :

1- يتم سحب 5 مل من عينة الدم باستخدام محقنة طبية معقمة وتوضع في انابيب البولي بروبلين الحاوية على مواد مانعة للتخثر.

2- يضاف اليه 15 مل من بفر TE وتمزج بصورة جيدة وذلك بقلب الانابيب عدة مرات.

3- يطرد المزيج مركزيا عند 10000 دورة لمدة 10 دقائق على درجة 4 م°.

4- ينبذ الراشح باستخدام البايبيت مع تجنب فقدان الراسب.

5- يغسل الراسب بالبفر TE عدة مرات وذلك بإعادة الخطوات من 1-4 مرة الى ان يتحول الى لون وردي.

6- يضاف 8 مل من Lysis buffer A وينقل المعلق الى انابيب بحجم 30 مل ويغطى بالبارا فيلم ويمزج بصورة جيدة بقلبه عدة مرات وبعدها يوضع على الثلج لمدة 10 دقائق.

7- يطرد المزيج مركزيا على 1000 دورة لمدة 15 دقيقة 4 م°.

8- ينبذ الراشح مرة اخرى باستخدام بايبيت مع تجنب نبذ الراسب ويعلق الراسب في 1 مل من TBS buffer.

9- يضاف 1 مل من lysis buffer B و 100 مايكروليتر من Proteinase K .

10- تحضن الانابيب لمدة 24 ساعة في الحمام المائي على درجة 55- 60 م° مع التحريك.

11- تخرج العينات من الحمام المائي ويضاف اليها 1 مل من الفينول المشبع و1 مل من مزيج كلوروفوم والايزوامايل .

12- تحرك الانابيب بقلبها عدة مرات لمدة خمس دقائق.

13-توضع الانابيب في الطرد المركزي على سرعة 10000 دورة ولمدة 10 دقائق.

14-تؤخذ الطبقة العليا باستخدام بايبيت معقمة الى انابيب جديدة مع توخي الحذر عدم ملامسة الطبقة السفلية.

15-يضاف اليه 2 مل من مزيج الكلوروفوم وايزوامايل وتمزج لمدة 5 دقائق بتقليب الانابيب.

16- توضع الانابيب بالطرد المركزي مرة اخرى على سرعة 10000 دورة لمدة 10 دقائق.

17- ينقل الراشح الى انابيب نظيفة مع عدم ملامسة الطبقة الوسطى.

18- يضاف الامونيوم استيت عند التركيز 2.5 مولاري ويضاف 2.5 مل حجم من الكحول تركيز 95% البارد .

19-تقلب الانابيب عدة مرات الى ان يترسب الــDNA.

20- عندما يكون تركيز الـــDNA عالي نلاحظ ممكن رؤيتها بالعين المجردة ويفضل سحب الـــ DNA باستخدام باستور بايبيت افضل من ترسيبه بالطرد المركزي.

21- يجفف الـــDNA وبعلق ب 2 مل من TE وتترك في درجة حرارة المختبر الى ان يذوب الـــ DNA.

22- يحفظ في الثلاجة في ظروف التجميد الى حين الاستخدام .

طريقة عزل الـــDNA من النبات :-

1- تحصد الاوراق النباتية من نبات الرز مثلا وتقطع باستخدام الشفرة وتوضع في الهاون الخزفي.

2- يضاف اليها كمية من النايتروجين السائل بحذر وتطحن بصورة جيدة الى ان يتحول لون النسيج النباتي من اللون الاخضر الى اللون الرمادي.

3- ينقل كمية من الرماد الناتج الى فلاسك حجم 50 مل باستخدام قفازات لتجنب ملامسة اليد بالخلايا النباتية .

4- يضاف 12 مل من Extraction buffer وتمزج بصورة جيدة وتوضع الفلاسكات في الحمام المائي لمدة ساعة على درجة حرارة 65 م° وبعدها تخرج الانابيب من الحمام المائي وتترك فترة في درجة حرارة المختبر للإزالة الضغط الناتج عليها.

5- يضاف 15 مل من الكلوروفوم والايزواميلي نسبة (1:24) وترج الانابيب بصورة جيدة بقلبها عدة مرات وتطرد مركزيا لمدة 15م° دقيقة على سرعة 8000 دورة لكل دقيقة.

6- تسحب الطبقة العليا بحذر الى انابيب نظيفة ويضاف اليها ضعف الحجم من الايثانول المطلق البارد اذا كان الراشح 5 مل يضاف 10 مل من الايثانول البارد تقلب الانابيب بصورة جيدة عدة مرات

7- يسحب الـــDNA باستخدام باستور بايبيت .

8- يغسل الـــDNA باستخدام الكحول تركيز 70% وتجفف بالهواء.

9- توضع في انابيب ايبندروف نظيفة وتعلق بـــ 200 مايكروليتر الى 300 مايكروليتر في TE buffer وتحضن في درجة 65 م° لمدة 20-30 دقيقة او تترك الى ان تذوب وتحفظ في الفريز لحين الاستخدام.

بفر الاستخلاص:

1M Tris-base, pH 8.0, 0.025 M Na_2EDTA, 1.4M NaCl, 2% CTAB

عزل الــ DNA من الخميرة :-

1- تنمى الخميرة في 5 مل من الوسط YPG لمدة 48 ساعة عند درجة حرارة 30 م°.

2- تحصد الخلايا في انابيب ايبندروف على سرعة 5000 دورة لمدة 2 دقيقة عند درجة حرارة 4 م°.

3- ينبذ الراشح ويترك الراسب ويضاف له 500 مايكروليتر من المحلول المتكون من 1M sorbitol و 0.1M Na_2EDTA ذات الاس الهايدروجيني 8 وتحضن في حاضنة هزازة في درجة حرارة 73م° لمدة ساعتين.

4- تخرج الانابيب من الحاضنة وتطرد مركزيا على سرعة 8000 دورة ولمدة 2 دقيقة على درجة حرارة 4 م° وينبذ الراشح.

5- تعلق الخلايا في 500 مايكروليتر من المحلول المتكون من , 50mM Tris-HCl 20mM Na_2EDTA pH 8 وبعدها يضاف 50 مايكروليتر من 10% SDS وتحضن في درجة حرارة 65 م° لمدة نصف ساعة.

6- يضاف 200 مايكروليتر من بوتاسيوم استيت الاس الهايدروجيني 4.8 الى كل انبوبة وتترك الانابيب في حمام ثلجي لمدة 60 دقيقة وتطرد مركزيا مرة اخرى لمدة 5 دقائق على سرعة 6000 دورة ودرجة حرارة 4 م°.

7- يؤخذ الراشح وتنقل الى انابيب نظيفة و يضاف له نفس الكمية من الكحول البروبانول وتبقى الانابيب لمدة خمس دقائق في درجة حرارة المختبر لمدة 5 دقائق ومن ثم تطرد الانابيب مركزيا لمدة دقيقة يلاحظ تكون راسب ابيض .

8- يغسل الراسب بإضافة 500 مايكروليتر من الايثانول 70 % وتطرد الانابيب بالطرد المركزي لمدة دقيقة على سرعة 6000 دورة على درجة 4 م°.

9- تجفف الانابيب بالهواء وتعلق في 100 مايكروليتر من TE buffer.

عزل البلازميدات من البكتريا بطريقة التحلل القاعدي:

1- يلقح 50 مل من الوسط nutrient broth حاوي على المضاد الحيوي وبالتركيز الذي يقاومه بمستعمرة منفردة من البكتريا وتحضن لمدة 24 ساعة على درجة 37 م°.

2- تحصد الخلايا البكتيرية في انابيب بالطرد المركزي على سرعة 8000 دورة لمدة 10 دقائق درجة 4 م°.

3- تعلق الخلايا ب 2 مل من المحلول I وتترك لمدة عشر دقائق وبعدها يضاف لها 10 ملغم من انزيم lysozyme وتترك في درجة حرارة المختبر لمدة 10 دقائق.

4- يضاف 4 مل من المحلول II وتمزج جيدا باستخدام الدوار وتترك في درجة حرارة المختبر لمدة 10 دقائق.

5- يضاف 2 مل من 5 مولاري من potassium acetate وتوضع في حمام ثلجي لمدة 10 دقائق.

6- تطرد الانابيب بالطرد المركزي على سرعة 8000 دورة ولمدة 15 دقيقة في درجة حرارة 4 م° لترسيب بقايا الخلايا والــDNA الكروموسومي.

7- ينقل الراشح الى انابيب نظيفة ويضاف اليه نفس الحجم من المزيج المكون من الكلوروفوم والكحول الايزواميلي بنسبة 1:24 وتقلب الانابيب مرة الى مرتين لمزج المكونات وتطرد مركزيا على سرعة 8000 دورة لمدة 10 دقائق على درجة حرارة 4 م°.

8- تكرر الخطوة عدة مرات للتخلص من البروتينات.

9- تسحب الطبقة المائية ومن ثم يضاف اليها عشر الكمية من المحلول III وضعف الحجم من الايثانول المطلق وتترك الانابيب لمدة 30 دقيقة في التبريد لترسيب الاحماض النووية.

10- تخرج الانابيب وتطرد مركزيا لمدة 10 دقائق على سرعة 8000 دورة و درجة حرارة 4 م° .

11 - يغسل الراسب بــ 5 مل من الكحول بتركيز 70%.

12- يجفف الراسب ويعلق ب 200 مايكروليتر من TE buffer.

طريقة تحضير المحاليل للطريقة المذكورة انفا:

A. Solution I
2% (w/v) glucose
50mM Tris-HCl pH8
80mM EDTA pH8

وظيفته توفير وسط ملائم لتحليل جدران الخلايا.

B. Solution II
0.2M NaOH
1% SDS

يؤدي الى تحليل اغشية الخلايا تذويب الدهون.

Solution III 3M Sodium Acetate (pH 4.8)

تحضر من اذابة 204 غرام من خلات الصوديوم في 250 مل مــن المــاء المقطر ويضبط الاس الهايدروجيني الى 4.8 باستخدام حامــض الخليك الثلجي ويكمل الى 500 مل بالماء المقطر وتعقم وتحفظ في الثلاجة.

5M Potassium Acetate Solution (pH 4.8)

يحضر من اذابة 24.4 غرام من خلات البوتاسيوم في 60 مل من الماء المقطر ويضاف اليه 11.5 مل من حامض الخليك الثلجي ويضبط الاس الهايدروجيني الى 4.8 ويكمل بالماء المقطر الى 100 مل بإضافة 28.5 مل من الماء المقطر وتبرد قبل الاستخدام.

ملاحظة: وظيفته فصل الــDNA البلازميدي عن الكروموسومي وعن بقية مكونات المحلول

تحضير 1 مولاري من Tris

يحضر من اذابة 121.14 في 900 مل من الماء المقطر ويضبط الاس الهايدروجيني الى 8.0 ويكمل بالماء المقطر الى لتر ويعقم.

تحضير 1 مولاري Na_2EDTA

يحضر من اذابة 372.24 غرام من EDTA في 900 مل من الماء المقطر ويضبط الاس الهايدروجيني الى 8 ويكمل بالماء المقطر الى لتر ويعقم ويحفظ في الثلاجة.

TE (Tris-EDTA) Buffer (pH 8.0)

10mM Tris- HCl pH 8.0

1mM EDTA pH 8.0

يحضر من مزج 1 مل من 1 مولاري ترس و 100 مايكروليتر من المادة الثانية تركيز 1 مولاري ويكمل بالماء المقطر الى 100 مل ويعقم ويحفظ بالثلاجة.

<u>القياس الكمي للأحماض النووية باستخدام UV- Visible Spectrophotometer</u>

يتم حساب تركيز الــDNA حسب القانون الاتي:-

Unknown(µg/ml) = O.D $_{260}$ x dilution factor x 50 µg/ml

1) يتم تصفير الجهاز من خلال قياس الطول الموجي للبفر لوحده (المستخدم لحفظ وتخفيف الــDNA) حيث تملا أنبوبة زجاجية كوارتز(Cuvette) خاصة بجهاز قياس الامتصاصية(مطياف U.V الضوئي) بالبفر وبما انها لا تحوي على عينة DNA فتعتبر القراءة صفر وحتى لو لم تقرا صفر يتم تصفيره.

2) توضع عينة الــDNA داخل الكيوفيت ويثبت الطول الموجي عند 260 نانوميتر وتتم ملاحظة قراءة الجهاز وتسجل الامتصاصية (O.D) وتستعمل المعادلة ويستخرج التركيز.

3) بما انه عينة الــDNA المستخدمة للقياس كبيرة تقدر بــ1-2 مل ولا يمكن اعادتها للمحلول الاساسي لعدم تعقيم ظروف القياس والكيوفيت.لذلك يفضل اخذ كمية صغيرة تقدر بالمايكرولتر وتخفيفها وحساب ذلك في المعادلة من خلال معامل التخفيف.

وتستعمل نفس المعادلة السابقة لقياس تركيز الــRNA ولكن يختلف الثابت حيث يكون40

Unknown(µg/ml) = O.D $_{260}$ x dilution factor x 40 µg/ml

الثانية : تقدير نقاوة الــDNA

$$\text{Purity of DNA} = \frac{\mathbf{O.D_{260}}}{\mathbf{O.D_{280}}} \qquad (1.8\text{-}1.6)$$

أي تحسب امتصاصية عينة الــDNA عند الطول المــوجي 260 نــانوميتر ثــم تحســب الامتصاصية للعينة نفسها عند الطول الموجي 280 نانوميتر وبعد قسمة الامتصاصية الاولى على الثانية يجب ان يكون الناتج تتراوح ما بين (1.6−1.8) واذا كان **اقل** فهذا يعني ان العينة غير نقية وتحتاج تنقية او اعادة استخلاص.

وتستخدم المعادلة نفسها لتقدير نقاوة الــRNA ولكن يجب ان يكون الناتج اكبر او يساوي **2** وكالاتي:

$$\text{Purity of RNA} = \frac{\mathbf{O.D_{260}}}{\mathbf{O.D_{280}}}$$

الترحيل الكهربائي في الهلام Gel electrophoresis:−

الترحيل الكهربائي هي تقنية تستخدم لعزل المواد حسب معدل حركتها تحــت تــأثير المجال الكهربائي مثل الاحماض النووية والبروتينات.

المبادئ الاساسية في عملية الترحيل الكهربائي :−

الفكرة الاساسية في عملية الترحيل الكهربائي هو فصل الجزيئات بالاعتماد على الشحنة الكهربائية. بما ان شحنة الــDNA تكون شحنتها سالبة بسبب احتوائها على مجاميع الفوسفيت PO_4 في الهيكل البنائي لتركيب جزيئة الــDNA لذلك فان جزيئة الــDNA تتحرك نحو القطب الموجب اثناء عملية الترحيل الكهربائي. يستعمل الجل المكون من **مادة الاكاروز**− وهي مادة مأخوذة من نباتات بحرية−حيث يتم عمل هلام الاكاروز عن طريق اذابة المادة في محلول منظم وتسخينه حتى يصبح المحلول صافيا ومن ثم صب الاكاروز في قالب خاص حتى يبرد مما ينتج عنه مادة جيلاتينية مرنة يتم استخدامها في عملية الفصل ومن مميزاتها انها تحوي على ثقوب صغيرة او فتحات مملوءة بالماء فأحجام هذه الثقوب تساعد على عملية فصل الاحماض النووية، واثناء عملية الفصل يوضع الهلام داخل حوض يحوي

محلول منظم وفيه قطبان (سالب وموجب). يتم تحليل الحامض النووي عن طريق وضعه في حفر خاصة في الجل ومن ثم دفعه للأمام بواسطة فرق جهد كهربائي فيبدا الحامض النووي بالانتقال الى القطب الموجب من القطب السالب وهذا يكون تحت عدة عوامل منها:-

1- قوة فرق الجهد.

2- تركيز الاكاروز.

3- حجم قطعة الحامض النووي فكلما كانت اصغر كانت اسرع مثلا البلازميدات تتحرك بصورة اسرع من الكروموسوم .

عادةً تستخدم وحدة الترحيل الافقية لهلام الاكاروز، والحامض النووي ذاته غير مرئي في الهلام لهذا يتم صبغه بمادة ترتبط به قبل وضع العينات في الجل ومن امثلتها مادة الاثيديوم برومايد التي تتألق عند تعرضها للأشعة فوق البنفسجية.

متطلبات عملية الترحيل الكهربائي:-

المواد:-

اكاروز، بفر الترحيل، بفر التحميل ، ماء مقطر، صبغة الايثيديوم برومايد، عينات الـ DNA المستخلصة.

المحاليل المستخدمة:-

1-بفر الترحيل

1X TBE borate-EDTA Solution.

Tris

3.02 gm Tris- base
1.5 gm boric acid
0.9gm EDTA

تذاب الكميات في 500 مل من الماء المقطر ويضبط الاس الهيدروجيني الى 8.4.

10X Alec's Buffer Solution

44.4 g Tris-
3.7 g EDTA
0.5ml Ethidium Bromide (10mg/ml)

تذاب الكميات في 900 مل من الماء المقطر ويضبط الاس الهايدروجيني الى 7.7 باستخدام حامض الخليك الثلجي وبعدها يكمل الى لتر .

2- صبغة التحميل :

ان فوائد صبغة التحميل اعطاء اللون لعينات الـDNA المراد تحمليها وزيادة كثافتها لذلك من السهولة تحمليها في حفر الاكاروز، ومن مميزات هذه الصبغة ايضا تكون سالبة

الشحنة في البفرات المتعادلة ووزنها الجزيئي اقل من الـــDNA لذلك فهي تسير بسرعة اكبر من جزيئة الـــDNA اثناء عملية الترحيل ، وعن طريق هذه الصبغة بالإمكان معرفة حركة وسيران الـــDNA اكثر الصبغات الشائعة الاستعمال Bromophenol Blue وتحضر هذه الصبغة بالطريقة الاتية

0.025 gm Bromophenol blue dye
0.025 gm Xylene
4 gm Sucrose

تذاب في البداية في كمية قليلة من الماء المقطر ويكمل الحجم الى 10 مل بالماء المقطر.
او تحضر كالاتي:-

1ml 10%SDS
2ml 250 mM EDTA pH 8.0
0.2ml 1M Tris-HCl pH 8.0
5ml 100% glycerol
10mg Bromophenol blue

ويكمل بالماء المقطر الى 10 مل.

3- صبغة الايثيديوم بروميد :

صبغة متألقة تستخدم لتصبيغ جزيئات الاحماض النووية وتحضر من اذابة 10 ملغرام من المادة في 100 مل من الماء المقطر وتوضع في قناني زجاجية معتمة بعيدة عن الاضاءة هذه الصبغة تركيبها مشابهة لجزيئة الـــDNA فتتداخل مع جزيئة الـــDNA مكونة معقد عند تعرضه للأشعة فوق البنفسجية طوله من 360 الى 300 نانوميتر فيقوم بامتصاص بعض طاقتها وبث اطوال مرئية وهي الظاهرة المعروفة بالتفلور فتظهر اشرطة الـــDNA مضيئة مما يعطيها لون برتقالي بعد رؤيته باستخدام جهاز Transilluminator.

ملاحظة : مادة الايثيديوم بروميد هي مادة مطفرة لذلك يجب توخي الحذر من استخدام هذه المادة وارتداء القفازات اثناء تصبيغ هلام الاكاروز.

Transilluminator-4 : -

صندوق حاوي على الاضاءة للأشعة فوق البنفسجية ذات الطول الموجي 312 نانوميتر من اجل التقصي او الكشف عن جزيئات الاحماض النووية.

5-تحضير الاكاروز:

1- بصورة عامة يستخدم 0.8 غرام من الاكاروز ويذاب في 100 مل من محلول بفر الترحيل 1X تستخدم كميات من 2-4% بالنسبة لعملية فصل قطع الـــDNA الصغيرة الحجم ولكن بالنسبة لقطع كبيرة الحجم تستخدم تراكيز من 0.8- 0.7%.

2-يسخن المحلول الى درجة 100 م° الى ان يصبح المحلول صافيا تماما ، يبرد المحلول الى درجة 50 م° تقريبا .

3- ومن الممكن في هذه الخطوة اضافة 5 مايكروليتر من صبغة الايثيديوم بروومايد تركيز 10 ملغم/ مل لكل 100 مل من هلام الاكاروز.

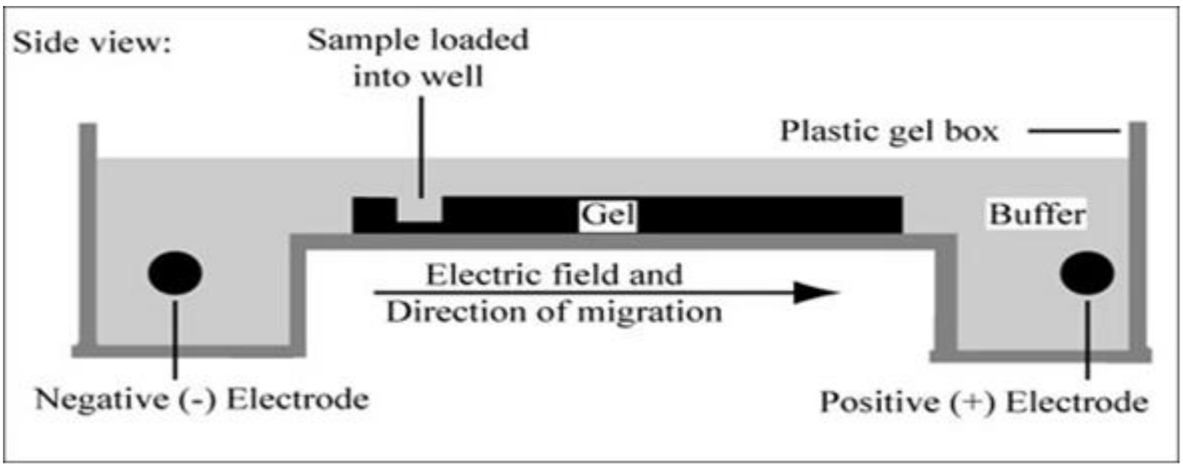
3- تحضر صفيحة الاسناد الاكاروز (Tray) ويصب الهلام بعد غمس مشط الحفر (Comb) قرب احدى نهايتي الصفيحة ويترك الاكاروز ليتصلب بوضع افقي لمدة 30 دقيقة تقريبا او اكثر ان تطلب الامر.

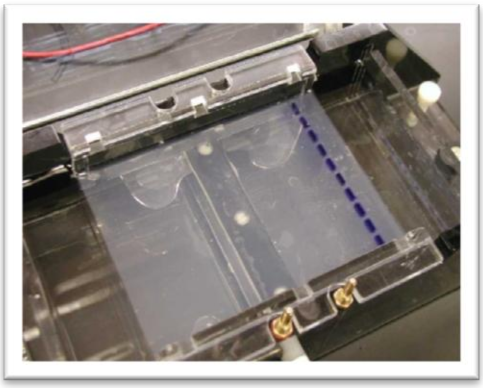
4- يرفع المشط من الهلام المتصلب ويرفع حوافي الاسناد ومن ثم توضع الصفيحة في وحدة الترحيل أي حوض الترحيل الافقية ويغطى الاكاروز المتصلب بمحلول بفر الترحيل.

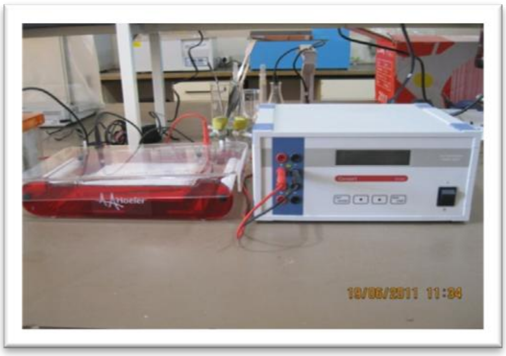
5- يتم تحميل عينات الـــDNA داخل الحفر المتكونة كلاتي: مزج 20 مع 5 مايكروليتر من الصبغة التحميل وترج المكونات بشكل جيد ثم تملى بالحفر المخصصة ، ترحل العينات لمدة 15 دقيقة على فولطية واطئة 45 وبعدها تحول الفولطية الى 60 فولط لمدة 2-3 ساعات .

6- يتم تصبيغ هلام الاكاروز بصبغة الايثيديوم برومايد تركيز (10 ملغم / 100 مل) لمدة بين 5-10 دقائق وبعدها تغسل بالماء المقطر.

7- يتم الكشف عن الـــ DNA بعد تعريض الهلام الى الاشعة فوق البنفسجية بوساطة جهاز UV Transilluminator.







معدل هجرة الـــ DNA في هلام الاكاروز:-

ان نسبة هجرة الـــ DNA في هلام الاكاروز تعتمد على مجموعة من العوامل:

- حجم جزيئة الـــ DNA: هجرة جزيئات الـــ DNA ذات الشريط الثنائي في هلام الاكاروز تتناسب عكسيا مع اللوغاريتم السالب لعدد القواعد النايتروجينية، فالجزيئات الكبيرة تهاجر بصورة بطيئة وذلك لامتلاكها مقاومة احتكاك عالية مقارنة لجزيئات الـــDNA صغيرة الحجم.
- الهيئة البنائية لجزيئة الـــ DNA: تهاجر جزيئات الـــDNA الفائقة اللف والحلقية المفتوحة والجزيئات المستقيمة بمعدلات مختلفة في هلام الاكاروز .

على سبيل المثال البلازميدات المعزولة من بكتريا الـــ *E. coli* من صفات هذه البلازميدات انها تكون حلقية مغلقة وفائقة اللف وتكون مدمجة الى حد ما لذلك اثناء الترحيل الكهربائي يكون نسبة هجرتها في هلام الاكاروز سريعة ولكن اذا تم كسر في احدى اشرطة الـــ DNA حيث تفقد هذه البلازميدات هيئتها البنائية الفائقة اللف وتصبح جزيئات البلازميدات مسترخية سوف تكون معدل جريان هذه القطع بطيئة. ولكن اذا تم قطع البلازميد الفائق اللف باستخدام احدى انواع الانزيمات القاطعة سيكون معدل جريان الـــ DNA الخطية ما بين الفائقة اللف والمسترخية لذلك فان جزيئات الـــ DNA الحاوية على نفس العدد من القواعد النايتروجينية ممكن ان تهاجر بنسب مختلفة ومواقع مختلفة في هلام الاكاروز وهذا يعتمد على الهيئة البنائية لجزيئة الـــ DNA .

- وجود مادة الايثيديوم برومايد في بفر الترحيل الكهربائي: ان وجود هذه الصبغة المتداخلة بين جزيئات الـــDNA تسبب في تقليل الشحنة السالبة لجزيئة الـــ DNA الثانية الشريط وتزيد من صلابتها وطولها.

- الفولتية المطبقة اثناء الترحيل : زيادة الفولتية المزودة من جهاز مزود القدرة يقلل من عملية فصل جزيئات الــ DNA وتفضل الفولتية المعتدلة.
- نوع هلام الاكاروز: هجرة جزيئات الــ DNA اثناء الترحيل الكهربائي تتأثر بصورة مباشرة مع تركيب والقوة الايونية لبفر الترحيل الكهربائي، ففي حالة غياب الايونية في بفر الترحيل فان هجرة جزيئات الــ DNA تكون بطيئة جدا.
- البفرات ذات الايونية العالية تؤثر بصورة مباشرة على التوصيلية الكهربائية لذلك فأنها تولد كميات من الحرارة وتؤثر على هلام الاكاروز ويمسخ الــ DNA.

<u>تحليل النتائج :</u>

بعد اجراء عملية الترحيل الكهربائي واظهارها بواسطة الاشعة فوق البنفسجية ، فان صبغة الاثيديوم برومايد المتألقة تتداخل بين القواعد النايتروجينية في جزيئات الــ DNA والــRNA لذلك فأنها تظهر بلون برتقالي براق في حالة وجود الــ DNA وأيضا ممكن استخلاص هذه القطع مرة ثانية في حالة استعمال الاكاروز ذات درجة الانصهار الواطئة low melting point واستخدام قطع الــ DNA في دراسات اخرى.

<u>ملاحظات اثناء الكشف عن الــDNA في هلام الاكاروز</u> .

في حالة عدم وجود أي حزمة في هلام الاكاروز يمكن ان تعزى الى الاسباب الاتية:-

- تحميل كميات غير كافية او تركيز الــDNA قليل.
- ممكن ان جزيئات الــ DNA قد تحطمت لذلك يجب اتخاذ الامور الازمة اثناء الاستخلاص للتجنب من التلوث بانزيمات Nucleases .
- في بعض الاحيان يمكن ان يكون الترحيل الكهربائي اكثر من الوقت الازم لذلك من المحتمل ان تخرج جزيئات الــ DNA خارج هلام الاكاروز وتسقط في بفر الترحيل.
- ممكن ان يكون الجهاز المستخدم لإظهار حزم الــDNA ذات نوعية غير جيــدة لذلك يفضل الأجهزة الحاوية على مصدر الاشعة فوق البنفسجية ذات الطول الموجي 312 او 320 نانوميتر.

تظهر جزيئات الــ DNA في هلام الاكاروز على شكل مسحة ممكن ان تعزى الى الاسباب التالية:

- التجنب من الانزيمات الــnuclease التي تحلل جزيئة الــDNA.
- تم تحميل كميات كبيرة من الــ DNA لذا من الممكن تقليل هذه الكميات.

- ظروف الترحيل تكون غير جيدة في بعض الاحيان كارتفاع درجة حرارة البفر والتي تؤدي الى تحلل جزيئة الــDNA.
- وجود كميات هائلة من الاملاح مع جزيئات الــ DNA لذلك ممكن التخلص منها باستعمال الايثانول.
- ممكن ان تكون الــDNA ملوثة مع البروتينات يفضل استخدام الفينول لإزالة البروتينات.

استخلاص البروتينات

البروتينات

مركبات عضوية معقدة التركيب ذات وزن جزيئي عالٍ تتركب من الاحماض الامينية تتواجد في تركيب كل المخلوقات الحية والفايروسات وهي الحجر الأساس في بناء الخلية وإدامة هيكلها ، بالإضافة الى كونها واسطات وظائف الخلية فالعديد من البروتينات تشكل الإنزيمات أو قد تدخل وحدات بروتينية في تركيب بعض الإنزيمات وتضم الخلية الاف الانواع من جزيئات البروتينات المختلفة في خواصها الحياتية و الكيميائية و الفيزيائية.

يتم استخلاص البروتينات من مصادرها أيا كانت لأغراض شتى مثل:-

1- تنقيتها وفصلها كل على انفراد لغرض تشخيصها وتقدير كميتها.

2- دراسة الخواص البيولوجية والكيميائية والفيزيائية للبروتينات لغرض استنباط علاقة التركيب بالوظيفة

3-مقارنة البروتينات المستخلصة من نماذج مختلفة لغرض استنتاج علاقات مفيدة في الاغراض الدراسية المقارنة.

4- استخلاصها للأغراض التجارية حيث تدخل في العديد من الصناعات الدوائية والغذائية.

ان طرق استخلاص البروتينات تعتمد على أسس كثيرة ومتنوعة ،فهنالك البروتينات غشائية الموقع، وهناك البروتينات سايتوبلازمية الموقع وكذلك توجد بروتينات عائدة لعضيات الخلية المختلفة كالمايتوكوندريا وجهاز كولجي والشبكة الاندوبلازمية بالإضافة الى ذلك فان مصدر البروتينات يمكن ان يكون غير خلوي وعليه فلابد من التأكيد على مصدر الاستخلاص عند القيام باستخلاص بروتينات معينة تنتمي الى عضية ما .

ترسيب البروتينات

ترسب البروتينات بعد استخلاصها لتخليصها من مختلف المواد غير البروتينية كما تستعمل طريقة الترسيب لتركيز محاليل البروتينات بالإضافة الى فصل البروتينات المختلفة عن بعضها (تنقيتها).

تترسب البروتينات عن محاليلها بإزالة الماء (المذيب)منها - تصبح غير ذائبة- وتستعمل انواع مختلفة من الاملاح في عملية الترسيب منها كبريتـــات الامونيـــوم ويمكـــن ترســـيب البروتينات ايضا بإضافة المواد الساحبة للماء كمادة **Poly ethylene glycol (PEG)** وفي كل الاحوال تحضر محاليل مرسبات البروتين في الماء بتراكيز مشبعة بالنســـبة للأمـــلاح او تراكيز معينة بالنسبة لمادة(**PEG**) وفي عملية الترسيب يضاف المرسب الى الرائق البروتيني للحصول على تركيز معين.

المواد:-

انابيب *محلول مشبع من كبريتات الامونيوم ويحضر بإذابة الملح الى درجة الاشباع (حسب الجداول العالمية)في الماء المقطر وغالبا ما نحصل على درجة الاشباع بإذابة 90 غم ملح الى 100مل ماء مقطر ويحفظ المحلول بحرارة الغرفة ويعدل pH الى 7عند الاستعمال.

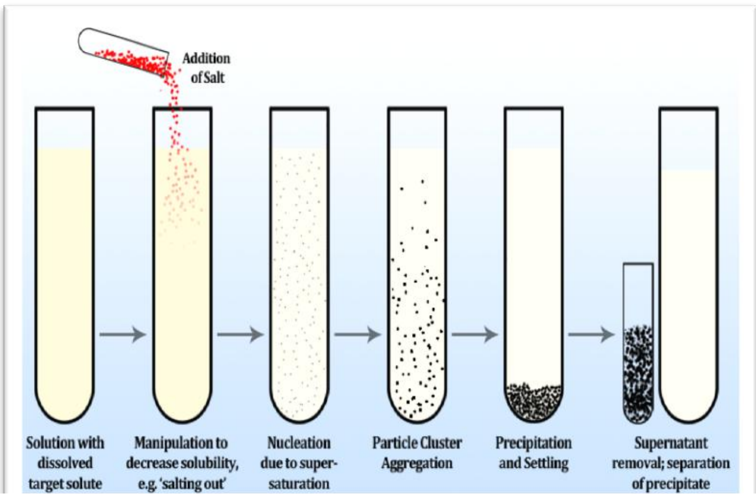
الطريقة:-

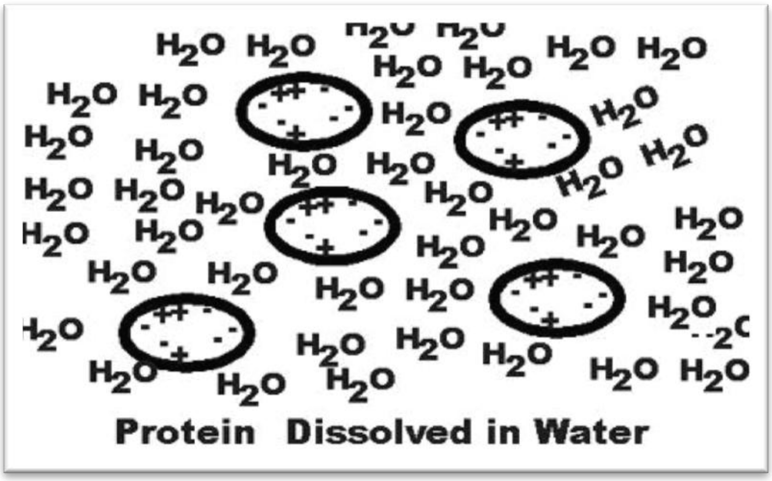
1- يؤخذ حجم معين من رائق الاستخلاص ويضاف اليه محلول كبريتات الامونيوم المشـــبع تدريجيا مع الرج المستمر ويفضل باستخدام المازج المغناطيسي.

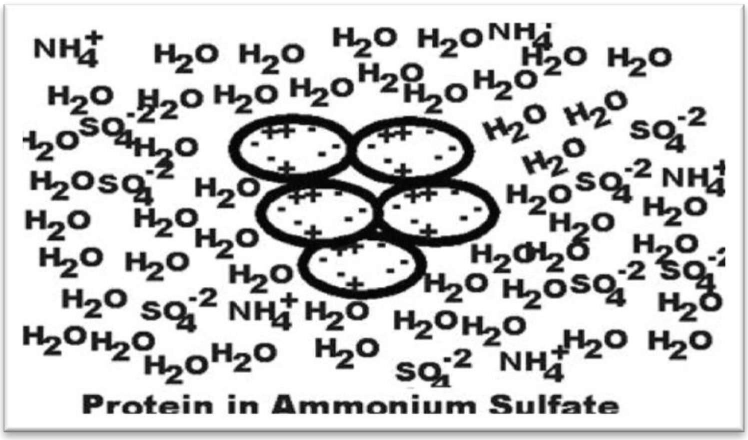
2- تبدا عملية الترسيب عند ظهور عكرة للبروتين المرسب وتحسب كمية الملح المضـــافة (أي في أي كمية من الملح بدأ ظهور التعكر)

3- يعزل البروتين بوساطة النبذ (5000دورة /دقيقة) لمدة 5 دقائق ويحفظ الراسب اما الرائـــق فيمكن ترسيب بروتينات اضافية بزيادة الاملاح.

ملاحظة:-هذه الطريقة وسيلة لترسيب وتجزئة وتركيز البروتينات غير المعرفة.







ملاحظة: توجد طرق ترسيب اخرى ،ويمكن استخدام الايثانول او الاسيتون لترسيب الكميـــات القليلة المتواجدة في المستخلصات البروتينية الصغيرة الحجم.

<u>الديلزة Dialysis</u>

الديلزة عملية تتضمن ازالة الأملاح عموما عن محاليلها وغالبا ما تستعمل الديلزة لإزالة الأملاح عن البروتينات بعد عملية الترسيب بهذه الأملاح حيث تستعمل أنابيب خاصة لهذا الغرض تسمى (Dialysis tubes) وهي انابيب رقيقة تشبه أوراق السلفين مصممة لتحتوي على ثقوب أقطارها تقاس بالانكسترومات. تختلف أقطار الثقوب في انابيب الديلزة وهذا يؤهلها لتستعمل في حجز البروتينات اعتمادا على أوزانها الجزيئية (اقطارها) كما تسمح تلك الاكياس بمرور جزيئات الاملاح من محلول

(البروتين- الملح) إلى الخارج وباستبدال المحلول- ماء مقطر او منظم - باستمرار يتم إزالة جزيئات الاملاح نهائيا من البروتين

المواد

انابيب ديلزة معقمة، ماء مقطر معقم، محلول البروتين المرسب بالأملاح، كلوريد الباريوم

الطريقة

1- تغلق النهاية السفلى للأنبوبة.

2- يسكب محلول الملح-البروتين (بعد إذابته بقليل من الماء المقطر) في انبوب الديلزة المحضر وتغلق النهاية العليا.

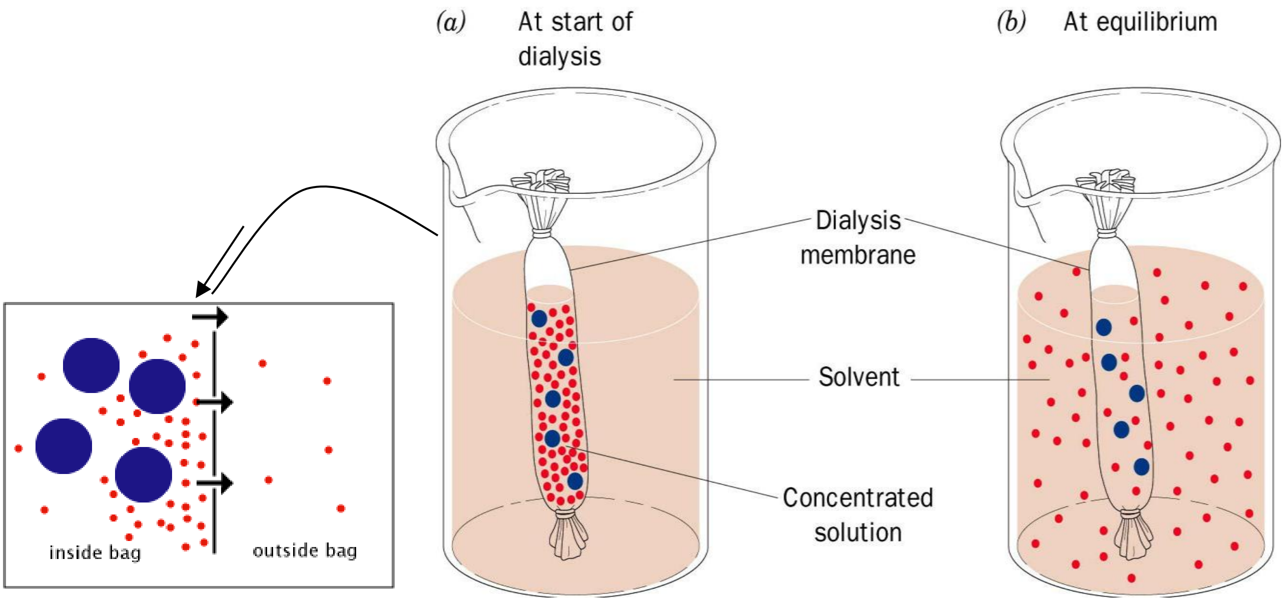
3- تعلق انبوبة الديلزة في سائل الديلزة لغمرها كليا .

4- يمكن تدوير سائل الديلزة الخارجي باستعمال محرك مغناطيسي للإسراع في عملية تنافذ الايونات.

5- يبدل محلول الديلزة بين حين وآخر- كل 24 ساعة- لعدة مرات.

6- يمكن التأكد من انتهاء وجود الأملاح في محلول الديلزة بإضافة عدة قطرات من كلوريد الباريوم الى محلول الديلزة حيث تكون راسب دلالة على وجود كبريتات الامونيوم.

7- يفصل محلول البروتين الخالي من الأملاح ويحفظ بدرجة 20 م°.



تعتبر العملية التي تم ذكرها اعلاه الخطوة الاولى في تنقية البروتينات يتبعها اســتخدام column chromatography من اجل الحصول على البروتين المراد تنقيته .

تقدير البروتينات

تقدر كميات البروتينات بعد كثير من الخطوات المتعلقة باستخلاصها وتجزئتهـا مـن مصادرها .هنالك الكثير من الطرق التقديرية لكمية البروتينات مثل:

1) الطريقة الطيفية Spectrophotometer (المباشرة)

تحتوي اغلب البروتينات على الحامضين الامينين التايروسين والتربتوفان ويتصف هذان الحامضان في امتصاصهما بطول موجي قدره 275 و280 نانومتر على التوالي، وبما ان مستوى هذين الحامضين يكون ثابتا في كثير من البروتينات فان كمية الامتصاص (الكثافة الضوئية) تتناسب طرديا مع كمية هذين الحامضين ومن خلال استخدام معادلة خاصة يتم التعرف على تركيز البروتين وغالبا تستخدم هذه الطريقة لتقدير كمية بروتين منقى معروف النوع .

2) **الطرق اللونية**

1- **طريقة بايوريت Biuert method**

تتم هذه الطريقة من خلال استعمال تركيبة بايرويت ويعتمد أساس هذا التفاعل على تكوين لون ارجواني في المحلول الحاوي على البروتينات بسبب تكوين معقد بين ذرة النحاس في البايوريت مع النايتروجين في السلاسل الببتيدية وتستخدم هذه الطريقة لتقدير كميات االبروتينات التي يكون تركيزها اعلى من 1 ملغم/ مل في المحلول ولا تتحسس للتراكيز الاقل.

ب- طريقة برادفورد Bradford method

تعتمد هذه الطريقة على حقيقة أن صبغة الكوماسي بريلينت بلو Coomassie Brilliant Blue 250 توجد بلون أحمر ولكن عند ارتباطها بجزيء البروتين تتحول إلى اللون الأزرق وتمتاز هذه الطريقة بحساسيتها للتراكيز المنخفضة من البروتين.

الترحيـل الكهربائي فـي هـلام متعدد الاكريل امايد Polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)

تنتج مكررات الاكرلمايد بتشبيك (بلمرة) مادة الاكرلمايد(acrylamide) بمادة اخرى تعمل عمل المشبك Crosslinker تسمى بـ(bisacrylamide) مما ينتج وسطا هلاميا ذا فتحات تختلف باختلاف تركيز الاكرلمايد (T) وتركيز المشبك (C) وهذا الهلام لا يتصلب

بدرجة حرارة الغرفة لذا تضاف مادة مصلبة تعرف بـــAmmonium persulfate وتمتاز مادة الاكريلمايد قبل بلمرتها بكونها سامة –عصبيا– لذلك يجب الحذر عند التعامل معها وارتداء الكفوف وعدم استنشاقها .

وحدة الترحيل تكون عمودية ويصب الجل بين صفيحتين زجاجيتين او في انابيب خاصة مع خزانين علوي وسفلي يوضع فيهما البفر (المحلول المنظم). يستعمل هلام متعدد الاكرلمايد لتفريق قطع الدنا ذات الوزن الجزيئي الواطئ (اقل من 1 كيلو قاعدة) طولا ،كما يستخدم في فصل البروتينات المختلفة لمعرفة كفاءة التقنيات المستخدمة في الاستخلاص والتنقية او لتحديد الوزن الجزيئي او لتعيين نقطة التعادل الكهربائي لها ويتم تصبيغ البروتينات بعد اكتمال الترحيل بواسطة صبغةCoomassie Brilliant Blue 250 والتي تعطي الحزم البروتينية لوناً ازرقاً او بواسطة نترات الفضة للكميات القليلة جدا من البروتينات.

<u>الترحيل الكهربائي للبروتين</u>

<u>المواد:</u>

هلام Polyacrylamide، bisacrylamide، Ammonium persulfate ، d H2O ، SDS، ، مادة الـــ TEMED

<u>تحضير هلام متعدد الاكريلمايد</u>

في هذه الطريقة يتم تحضير نوعين من الهلام احدها الهلام الفاصل Separating gel ذات الاس الهايدروجيني العالي حيث تكون ثغور الهلام صغيرة والاخر الهلام الساند Stacking gel الذي يستقر فيه المشط ذات الاس الهايدروجيني الواطئ وتكون الثغور كبيرة .

لتحضير هلام متعدد الاكريمايد تركيز 12.5% يستخدم فيه مادة صوديوم دوديكايل سلفيت فائدة هذه المادة انها تعمل على مسخ جزيئات البروتين فتفقد البروتينات هيئتها البنائية الثنائية والثلاثية والرباعية و تغلف الببتيدات المتعادلة الشحنة بـــ مادة الـــSDS وتحولها الى شحنة سالبة لذلك تهاجر البروتينات الى القطب الموجب وتنفصل البروتينات اعتمادا على أوزانها الجزيئية ايضا ويستخدم في عملية الفصل مؤشرات معلومة الاوزان الجزيئية لغرض اجراء المقارنة وايجاد الاوزان الجزيئية للبروتين المراد معرفة وزنه الجزيئي والمثال على ذلك كالبروتينات القياسية التالية:–

67000 Dalton	**Bovine serum albumin ألبومين مصل البقر**
45000 Dalton	**Egg albumin ألبومين البيض**
36000 Dalton	**Pepsin الببسين**
14300 Dalton	**lysozyme اللايسوزايم**
21000 Dalton	**Papain البابين**

يمكن تحضير الهلام الفاصل من مزج المواد الاتية :

1-Separating Gel Mixture

6.25ml	30% Acrylamide
0.75ml	2% Bisacrylamide
5.6ml	1M Tris-HCl pH 8.7
0.1ml	20%SDS
2.3ml	D.W.
100µl	10% Ammonium persulphate
75µl	TEMED

بعد مزج المواد يسحب المزيج بواسطة محقنه طبية وملئ الفراغ بين لوحي الترحيل الزجاجيتين العموديتين ذات الابعاد (10.5 × 10 سم) الى ان تصل تقريبا ثلاثة ارباع صفيحة اسناد الهلام وبعدها يوضع البروبانول للحصول على سطح املس ويترك تقريبا لمدة ساعة ليتصلب وبعدها تحضر هلام الساند الذي يتكون من المواد الاتية:

2-Stacking Gel Mixture

1.7ml	30% Acrylamide
0.7ml	2% Bisacrylamide
1.25ml	1M Tris-HCl pH 6.9
50µl	20%SDS
6.35ml	D.W.
50µl	10%Ammonium persulphate
TEMED	25µl

وبعد مزج المكونات المذكورة سابقا ايضا تسحب بواسطة محقنة طبية وتملى بين صفيحتي الاسناد ويوضع المشط بسرعة قبل ان يتصلب وبعدها تترك لمدة ساعة اخرى لضمان تصلب الهلام ثم يوضع في حوض الترحيل الحاوي على بفر الترحيل المكون من المواد الاتية :

10X PAGE Buffer Solution

141g	Glycine
30g	Tris-base
10g	SDS

تذاب في لتر من الماء المقطر.

<u>طريقة تحضير العينات:</u>

تؤخذ على سبيل المثال 20 µl ويمزج مع كمية متساوية مع بفر التحميل ذات التركيز 1X من صبغة التحميل الخاصة بالبروتين المتكونة من المواد التالية

Protein Gel Loading Dye Solution (4X Treatment Buffer)

2ml 1M Tris-HCl pH 6.8
0.8g SDS
4ml 10% glycerol
0.4ml 14.7 M ß-mercaptoethanol
1ml 0.5 M EDTA
8mg Bromophenol blue

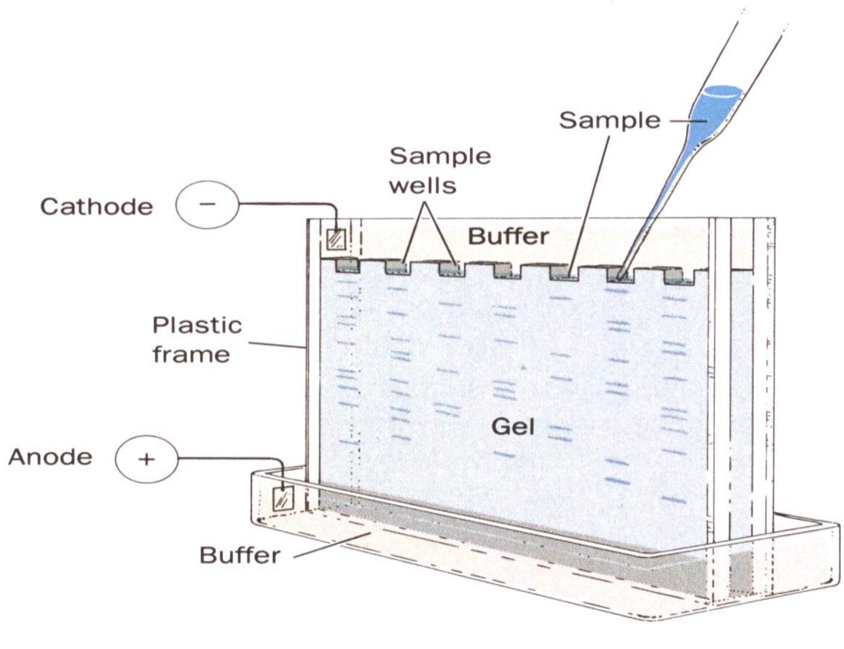
يكمل الحجم الى 10 مل بالماء المقطر.

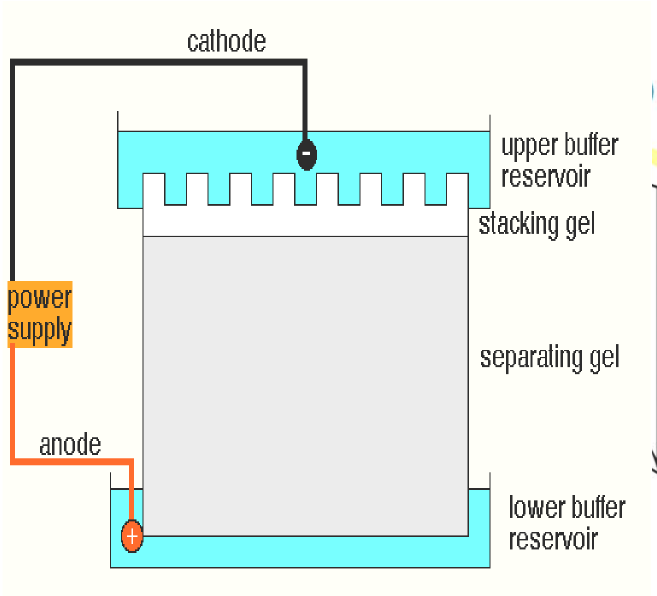
ويتم مزج العينات مع بفر التحميل في انابيب ابندروف و توضع في حمام مائي ذات درجة حرارة 100 درجة مئوية لمدة 5 دقائق لمسخ البروتينات وبعدها تحمل في حفر الهلام باستخدام محقنة طبية ثم ترحل العينات بجهد كهربائي 100 فولت و20 امبير لمدة 3 ساعة الى ان تصل صبغة التحميل الى نهاية الهلام تقريبا ومن ثم يرفع الهلام ونقوم بإزالة الصفائح الزجاجية المساند بحذر شديد تجنبا لكسر الهلام و ثم تصبغ بصبغة Coomassie Brillant Blue لمدة تقريبا ساعتين وبعدها تأتي مرحلة ازالة الصبغة باستخدام المحلول المكون من 50 مل ميثانول و 10 مل من حامض الخليك الثلجي ويكمل الى 100 مل باستخدام الماء المقطر.

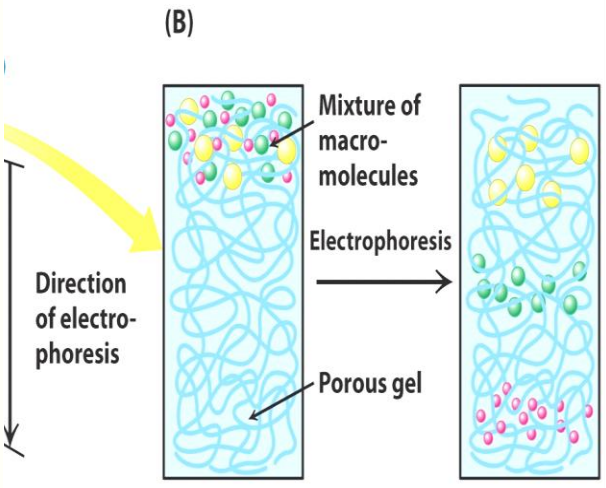
طريقة تحضير الصبغة

Gel Stain Solution

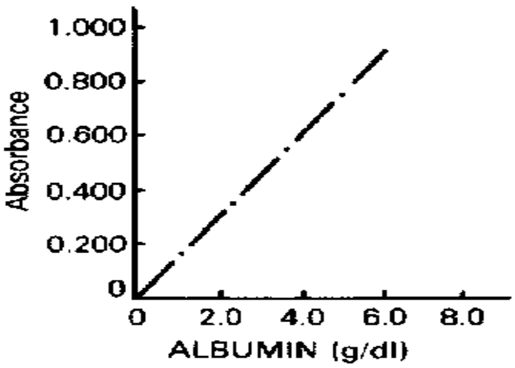
Coomassie Brillant Blue powder	0.2%
Methanol	50%
Glacial acetic acid	7%







<u>المنحنى القياسي Standard curve</u>



هو نوع من الرسم البياني (Graph) يستخدم كتقنية لتقدير تراكيز النماذج البايلوجية المجهولة وتشمل هذه التقنية استعمال مجموعة من العينات القياسية (Standards) ذات الصفات والتراكيز المعلومة والمتدرجة حيث تقاس بالجهاز وتحدد على الرسم البياني ويتكون (Stander curve) من خلال رسم خط مستقيم على النقاط المتكونة وبالتالي فان هذا الرسم يسمح بتحديد كميات النموذج المجهول (Unknown) من خلال التسقيط على الاحداثيات او من خلال استخدام معادلة خاصة.

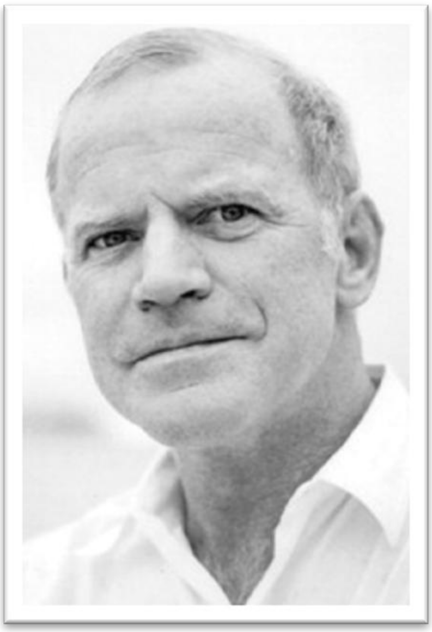
المنحنيات القياسية تقنية شائعة الاستخدام لتقدير البروتينات والـDNA وعلى سبيل المثال يستخدم بروتين المصل البقري(Bovine serum Albumin) كعينة معلومة قياسية تحضر منها مجموعة تراكيز و يرسم من خلالها منحنى قياسي .

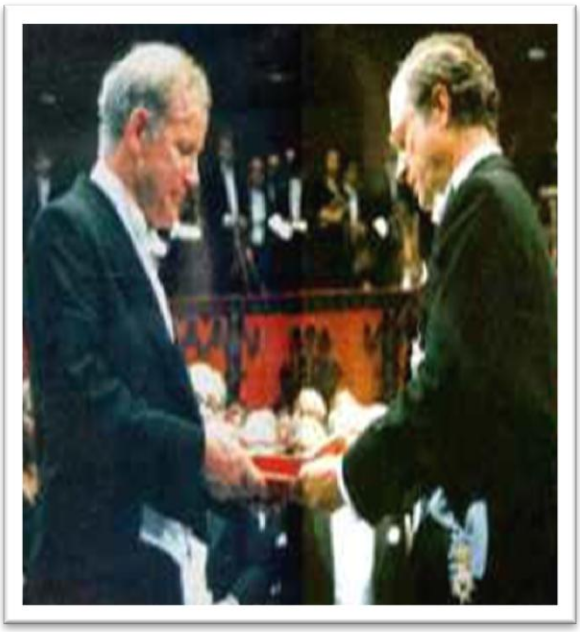
تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase chain reaction (PCR)

تقوم الخلية بمضاعفة كمية الحامض النووي وقت انقسام الخلية بشكل تلقائي و بشكل سريع مع وجود نظام تصحيح للأخطاء خلال النسخ. تبلغ سرعة النسخ المضاعفة إلى 1000 قاعدة نيتروجينية بالثانية (داخل النظام الحيوي) و هي تحدث في الخلية في وقت التكاثر والانقسام فقط. ومع التطور في مجال التكنولوجيا الحيوية والذي يقوم على التعامل مع الحامض النووي (DNA) بشكل أساسي، استدعى ذلك العلماء على أن يبحثوا عن طريقة أو تقنية تقوم على مضاعفة كمية الحمض النووي (DNA) بشكل كبير، خارج النظام الحيوي (الخلية).

كانت فكرة الاكتشاف بواسطة عالم كيميائي تتضمن فصل الحامض النووي DNA وصنع نسخ كثيره منه ..وفعلاً تحققت هذه الفكرة المبدعة ..بواسطة د.كاري مولس Kary Mullis سنة 1983 حيث خطرت بباله فكرة أن يفصل الحمض النووي DNA ويصنع منه نسخ كثيرة .

.وقلد في عام 1993 م جائزة نوبل في الكيمياء.



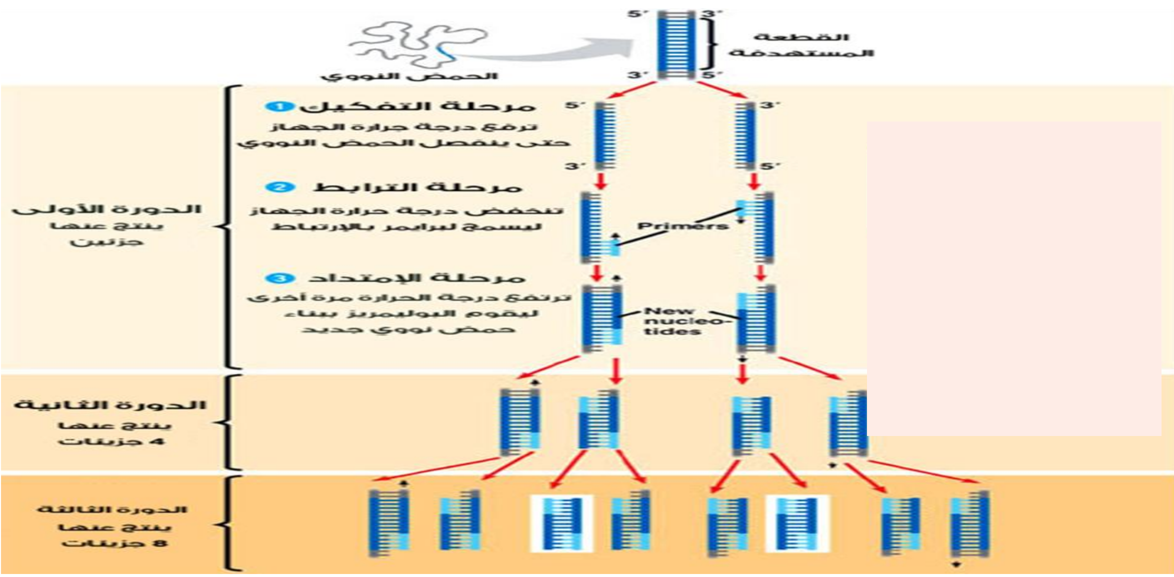


ما هو تفاعل البلمرة المتسلسل ؟

هو تقنية مختبريه تقوم على أساس تصنيع نسخ عديدة من قطع الحامض النووي DNA في المختبر (in vitro) ويمكن اعتبارها ترجمة مبسطة لعملية استنساخ الحامض النووي DNA اثناء الانقسام الخلوي لكن هذا الاستنساخ يتم خارج الجسم .بحيث يقوم جهاز

البلمرة الحراري برفع درجة الحرارة إلى 95 درجة مئوية فينفصل الحامض النووي إلى شريطين يعقبها إضافة النيوكليوتيدات لكل جزء تساعد على إنتاج مئات النسخ من النسخة الأصلية.

<u>الهدف</u> : تهدف التقنية الى تضخيم جزيئات قليلة من الحامض النووي DNA بعد استخلاصه من خلايا او سوائل الجسم وبالتالي الحصول على كميات كبيرة منها.



- ➢ الكشف عن الطفرات الوراثية : وذلك عن طريق وضع بادئ خاص للطفرة لتكثير الجين الخاص بها. ومنه نقوم بمعرفة المرض اذا كان على زوجين من الكروموسومات او على احدهما (allele) تعيين البصمة الوراثية.
- ➢ الكشف عن الفيروسات : وهذه الطريقة هي الأدق في تحديد نوع وجنس الفيروس وكميته.
- ➢ يساعد في تشخيص بعض الأمراض والتي تسببها بكتيريا أو فيروسات.
- ➢ ويستخدم في الاستنساخ وإنتاج خلايا أكثر.
- ➢ هو العنصر الأهم في عملية التجميع الجيني Recombinant الحامض النووي (DNA) حيث نقوم بتكثير الجين المراد إدخاله على البلازميد أو الحامض النووي (DNA) المضيف.
- ➢ استخدامه في تغير نهايات الجين لتصبح متوافقة مع إنزيمات القطع Restriction enzyme .
- ➢ هو العملية الأساس في تحديد تتابع القواعد النيتروجينية في الحامض النووي (DNA) الحامض النووي (DNA) Sequencer .
- ➢ معرفة طول الحمض النووي(DNA).
- ➢ تقنية الحمض النووي(cDNA).
- ➢ تحديد الجين المطلوب من خليط من الجينات.
- ➢ يستخدم في تقنية(Microarrays).

- في مشروع الخارطة الجينية البشرية(Human genome project)
- الساوثرين بلوت (Southern blot analysis)
- تقنية ارتباط الحمض النووي – (DNA) بروتين (الحمض النووي Protein- (DNA) .Interaction
- في مجال الطب الشرعي (اختبار الأمومة، حالات الاغتصاب، تحديد الهوية)... الخ وغيرها من التطبيقات المخبرية والبحثية.
- تحديد الأنماط الجينية Genotyping للفيروس الكبدي من نوع C .
- تشخيص الأمراض السرطانية بالكشف الجيني للتوضع غير الطبيعي للقواعد النايتروجينية للجينات الورميه Oncogenes .

<u>**متطلبات تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل**</u>

– عينة التفاعل او يسمى قالب الحمض النووي(DNA Sample)



انابيب تحوي على عينات الـــ DNA

2- البادئات (Primers):-

نوعان أمامي (Forward) و خلفي أي عكسي (Reverse).

عبارة عن تسلسل صغير من القواعد النايتروجينية يكون ذات تتابع مكمل لقطعة الــDNA المراد مضاعفتها وبصورة عامة البادئات المستخدمة في تفاعلات الــPCR تتكون من (20-30) قاعدة نايتروجينية وتزداد كفاءتها كلما زاد طولها عن 30 قاعدة نايتروجينية حيث يرتبط به انزيم البلمرة ليكون بداية التفاعل لبناء شريط جديد من الــDNA .

<u>**تصميم البادئات:**</u>

البادئات يجب ان يرتبط احدهما في المقدمة والاخر يرتبط بمسافة محددة بالاتجاه العكسي لذلك فان تصميم البادئات يعتبر خطوة حرجة في تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل لذلك

يجب ان يملك التحديد المطلوب المتمم لسلسلة الدنا المراد تضخيمه لأجل ذلك قام العديد من الباحثين بإجراء بعض الابحاث ووضعوا قائمة تتضمن مجموعة من الشروط لتصميم البادئات:-

1- طول البادئات تكون من 10 -30 نيكليوتيدة وكلما زاد طول البادئ يعطي مساحة افضل للأنزيم على البادئ وبالتالي نوعية افضل.

2- يجب ان لا يكون الفرق في درجة حرارة الانصهار في البادئات المستخدمة اكثر من 5 درجة مئوية ويمكن حساب درجة الانصهار حسب المعادلة التالية:

$$Tm= 4(G+C) +2(A+T)\ °C$$

3- جعل درجة الانصهار بين 65 و70 م° لكل بادى فوق درجة الالتئام .

4- استعمال درجة حرارة للالتئام اقل بـــ(15-10 م°) من Tm.

5- محتوى G و C لكل بادئ ينبغي ان يكون بنسبة (40-60%) من اجل الفعالية القصوى للتفاعل لكون G و C تربطها ثلاثة اواصر هايدروجينية فتتحمل درجات حرارة عالية .

6- الحصول على توزيع موحد من النيكليوتيدات G و C ، حيث غياب هذا التوزيع يؤدي الى غياب انتقائي او غير نوعي.

7- تفادى تعاقبات طويلة من نفس النيكلوتيد GGGG, CCCC.

8- يجب ان لا يكمل البادئات احدهما للأخر في خليط التفاعل حيث يشجع على تكوين بادئات dimmers ثنائي الجزيئات.

9- جعل النهاية -3 تنتهي ب C او G او CG او GC فان ذلك سيزيد من فعالية الكشف.

ملاحظة:

البادئات اما تكون ذات تتابع عشوائي والتي بإمكانها الارتباط على أي قطعة من الـــDNA مكملة لها وهذا يتطلب درجات حرارة واطئة لعملية الالتئام (30- 40) مئوية او متخصصة لجين معين او شبه متخصصة حسب نوع التفاعل وهذا يتطلب درجات عالية للالتئام.



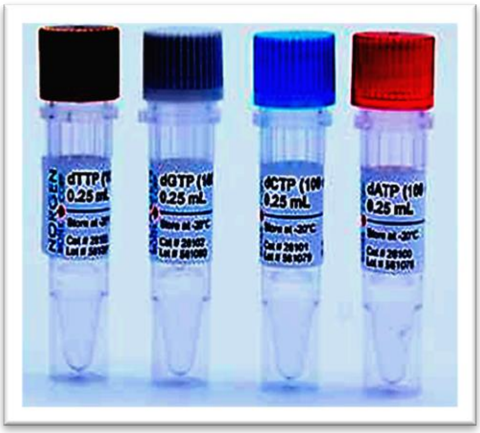
صورة لحاويات البادئات

3-انزيم التفاعل (Hot Star Taq polymerase) أو(Taq polymerase):

هو عبارة عن انزيم ثابت حراريا يتم عزله من نوع من البكتريا تسمى ***Thermus aquaticus*** التي تتواجد طبيعياً في الينابيع الحارة وهذا الانزيم عبارة عن متعدد ببتيد يتكون من سلسلة مفردة ذات وزن جزيئي يصل الـــ 95 كيلو دالتن وتعرف الوحدة الواحدة من انزيم البلمرة الـــDNA على انها الكمية الانزيم اللازمة لبناء نانومول من التركيز الكلي للنيوكليوتيدات في خليط التفاعل وتكوين شريط الـــDNA خلال وقت قدره 30 دقيقة وبدرجة حرارة 75 م° وتحت ظروف التفاعل المثلى. يتميز هذا الانزيم بان له القدرة على بناء سلسلة جديدة من الـــ DNA باستخدام سلسلة الـــDNA المفردة كقالب وذلك بإضافة النيكلوتيدات dNTPs وتتراوح درجة الحرارة المثلى لعمله (70-80 م°) ويبقى ثابتا في درجات الحرارة العالية التي قد تصل 96 م° .

4- النيوكليوتيدات المفسفرة :-

هي النيوكليوتيدات الاربعة منقوصة الاوكسجين التي تستخدم لبناء أي قطعة من الـــDNA (dATP، dCTP، dTTP، dGTP) هذه النيوكليوتيدات dNTPs ترتبط بالنهاية الحرة لمجموعة الهيدروكسيل للبادى بوجود انزيم البلمرة لتكوين الشريط المكمل للقالب. يتم تصنيعها وبنقاوة عالية اما بشكل منفرد او على شكل مزيج وان التركيز المثالي لإجراء تفاعلات البلمرة المتسلسل يعتمد على عدة عوامل منها تركيز $MgCl_2$ وتركيز البادئ وعلى عدد الدورات.



5- محلول منظم (PCR Buffer 10X).

ان هذا المحلول يعمل على تنظيم عمل انزيم البلمرة والمحافظة على نشاطه ومقاومة التغير في الاس الهايدروحيني عند اضافة حامض او قاعدة للحفاظ على الرقم الهيدروجيني اللازم لفعالية انزيم البلمرة ويتكون من عدة مواد Tris-HCl، $MgCl_2$ والذي يكون ضروريا لأجراء التفاعل وذلك لان ايونات المغنيسيوم ضرورية لعمل انزيم البلمرة فهي تزيد من فعاليته كذلك فان هذه الايونات تكون معقدا ذائبا مع النيكليوتيدات يتم بعد ذلك اضافته الى شريط الـــDNA.

6- الماء المقطر المعقم.

7-جهاز البلمرة الحراري (Thermocycler):-





يعد هذا الجهاز من اهم متطلبات اجراء تفاعل الـــPCR تم تصميم هذا الجهاز لتوفير درجات الحرارة المطلوبة لكل دورة ولجميع العينات المدروسة واستيعابه لعدد كبير من العينات ويستوجب الدقة في تنظيم البرنامج الذي يغذي الجهاز والمتضمن الدرجة الحرارية والمدة التي تستغرقها كل دورة اضافة لعدد الدورات والوقت المستغرق بين دورة واخرى.

<u>خطوات تقنية الــPCR</u>

ثلاث مراحل في الدورة الواحدة:

1- **مرحلة التفكيك الحراري Denaturation** : تعد هذه المرحلة الاولى والاساسية في تحضير الـــDNA القالب حيث يتم رفع درجة الحرارة إلى 94 ْم وذلك لفك الشكل المزدوج للحامض النووي (DNA) الأصل من d.s. DNA الى s.s.DNA. ان تلك العملية تحدث في الخلية in vitro اثناء الطور البيني من الانقسام الخلوي وبواسطة انزيمي الـــ DNA

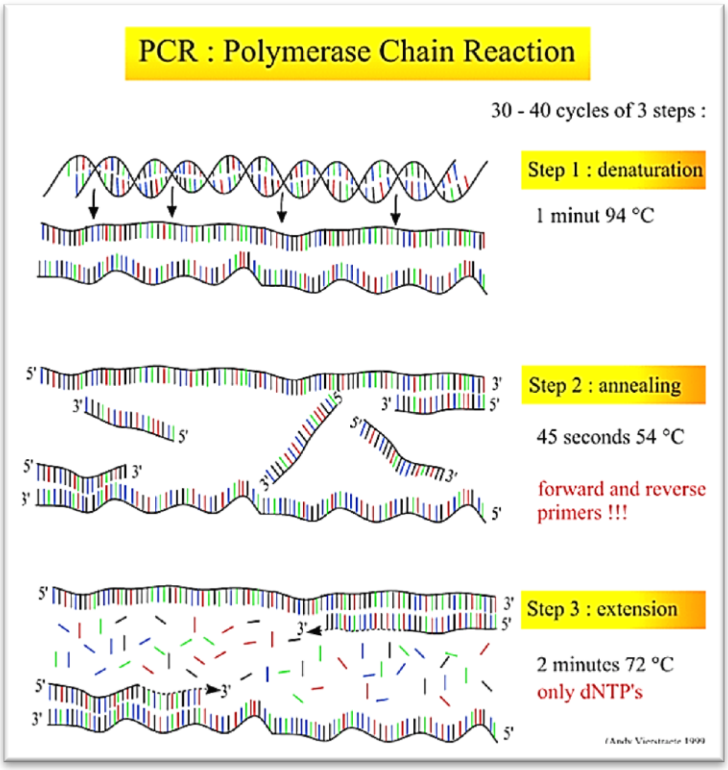
helicase والــtopoisomerase واذ ان ارتباط الشريطين يكون عن طريق الاواصر الهايدروجينية فقد وجد بان الحرارة العالية تؤدي الى فتح الشريطين. لقد استثمرت هذه الظاهرة في تحقيق المرحلة الاولى من الــPCR وذلك برفع درجة الحرارة لمفعول التفاعل والذي يحتوي قالب الــDNA من (92-95 م°) ولوقت يتراوح بين (3-5) دقائق للحصول على شريط مفرد ليعمل كقالب لبناء القطعة المكلمة لها وتعتمد عملية المسخ على عدد من العوامل كنوعية ومصدر الــDNA القالب.

2- **مرحلة التئام البادئات Primers annealing** : وهي المرحلة التي تأتي بعد مرحلة المسخ مباشرة اذ يتم فيها ارتباط البادئات مع التتابعات من القواعد النايتروجينية المكملة لها في الشريط المفرد من دنا القالب وذلك ببناء الاواصر الهايدروجينية بينها وتعتمد درجة الحرارة وطول الفترة الزمنية اللازمة لهذه المرحلة على العديد من العوامل التي تحدد كفاءتها ومنها تركيز وطول البادئ ونسبة احتوائه على قواعد الــG+C. يجب خفض درجة الحرارة إلى ما بين 55-60 ْم ليقوم البادئات بالالتئام فيزيائياً بواسطة الروابط الهيدروجينية مع الحامض النووي (DNA) الأصل.

3- **مرحلة الامتداد Extension:** وهي المرحلة الاخيرة من تفاعل الــPCR وتتضمن عملية اضافة الــdNTPs الى النهاية OH للبادى عند منطقة ارتباطه بقالب الدنا لتكوين شريط الــDNA مكمل لذلك القالب من قبل انزيم البلمرة . ان افضل درجة حرارية تتم فيها عملية الامتداد هي الدرجة الملائمة لإعطاء اعلى فعالية لأنزيم وهي 72 م° اما المدة اللازمة لذلك فتختلف حسب المؤشرات المستخدمة والمؤشرات التي تعطي نواتج تضاعف كبيرة الحجم تحتاج الى وقت اطول من تلك التي تعطي نواتج تضاعف قصيرة وذلك لقدرة انزيم البلمرة المستخدم Taq DNA polymerase على اضافة 35-100 نيكليوتيدة في الثانية وعلى العموم تكون الفترة اللازمة لاستطالة اطول 10 دقائق في الدورة الاخيرة لتفاعلات الــPCR وذلك لضمان استطالة جميع النواتج التفاعل.

مما يجدر للإشارة الى ان عدد الدورات المستخدمة في تفاعلات الــ PCR هي 40 دورة كافية للحصول على عدد نسخ ملائمة لــDNA الهدف بحيث يمكن رؤيتها عند الكشف عنها باستخدام هلام الاكاروز كما ان فعالية الانزيم تقل بعد ذللك العدد من الدورات. اما الكشف عن نواتج الــPCR فيتم بعدة طرق اكثرها شيوعا الهجرة الكهربائية باستعمال هلام الاكاروز والتصبيغ باستخدام اثيديوم برومايد والكشف باستخدام الاشعة فوق البنفسجية او باستخدام هلام متعدد الاكريل امايد والتصبيغ بصبغة نترات الفضة مع الكشف المباشر بالعين المجردة وان الطريقة الاخيرة تستغرق عدة ساعات.

هذه المراحل الثلاث تمثل دورة كاملة وفيها يصبح الحامض النووي (DNA) الأصل قد تضاعف ، وتعتمد كمية ناتج الحمض النووي (DNA) على عدد الدورات بشكل أسي .



عمليات التضاعف لقطعة الدنا بواسطة تفاعل الـــ PCR

طريقة عمل جهاز الـــ PCR

باستخدام لوحة المفاتيح وشاشة عرض الجهاز ، يتم ادخال الدورة المصممة لأي قطعه من الحمض النووي المفصول.

نظام التفاعل:

ان نظام التفاعل في تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل المثالي كما يلي :-

	الوقت	درجة الحرارة	الخطوات
تنشيط الانزيم والتهيئة لمرحلة تفكك الحامض النووي الـــDNA	5 دقائق	95 م°	1
مرحلة مسخ الـــ DNA	1 دقيقة	95 م°	2
مرحلة التئام البادئات بـــ DNA	1 دقيقة	30-65 م°	3

مرحلة الامتداد	2 دقيقة	72 م°	4
اعادة الخطوة من 2 الى 4 لدورات تتراوح من 25 -40 دورة			
ضمان اكتمال مرحلة الامتداد واعادة التفاف الشريطين مع بعضهما واكمال عدد الدورات للنسخ	10 دقائق	72 م°	5
	ما لانهاية	4 م°	6

<u>المؤشرات الوراثية</u>

تعرف المؤشرات الوراثية DNA markers بانها تتابعات من الـــDNA يمكن الاستدلال بها على موقع معين على الكروموسوم او الجين. تستخدم لدراسة العلاقات الوراثية بين الافراد وايجاد البصمة الوراثية لكونها تعكس الاختلافات في المعلومات الوراثية المخزونة فيهم وهذه الاختلافات تكون ناتجة اما من الحذف او الادخال او اعادة الترتيب للنيوكليوتيدات في جينوم الافراد المدروسة لأي سبب كان كالطفرات الوراثية لذلك اعتمدت في دراسات التصنيف الجزيئي Molecular taxonomy والدراسات التطورية Evolutionary studies وفي بناء الخرائط الوراثية Genetic mapping كما اصبحت من الادوات المهمة لدراسة التنوع الوراثي Genetic diversity .

من ابرز مميزات المؤشرات الوراثية انها تظهر التغاير الذي يحدث على مستوى الـــDNA مباشرة ، كما هو معروف ان الـــ DNA هو المادة الوراثية المستقرة وكذلك امتازت هذه المؤشرات بكونها تعتمد على الـــDNA الموجود في جميع خلايا الكائن الحي وبشكل متساوي لذا فان تحليل أي جزء من ذلك الكائن وفي أي مرحلة عمرية سوف تعكس النتيجة حالة الكائن الوراثية ومن مميزاتها الاخرى القدرة على كشف اعداد كبيرة من التباينات Numerous polymorphic مما جعلها قادرة على ايجاد أي اختلاف مهما كان طفيفا بين اقرب الانواع.

<u>انواع مؤشرات الـــDNA:-</u>

يعتمد استخدام المؤشرات الـــDNA بالاعتماد على التقانة المستخدمة ونوعية البادئ المستخدم ومن اكثر انواع المؤشرات المستخدمة انتشارا هي:-

1. **مؤشرات التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلة الــDNA**

Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)

من مميزات هذه المؤشرات انها تقوم بمضاعفة مواقع Loci على شريط الــDNA باستخدام بادئات عشوائية قصيرة Oligonucleotide ذات تتابع عشوائي تتكون من حوالي 10 قواعد نايتروجينية حيث تجد هذه البادئات مواقع مكملة لها على شريط الــDNA وان ناتج التضاعف يكون عبارة عن قطع مختلفة الاطوال والعدد ويعتمد طول وعدد القطع الناتجة على عدد مواقع الارتباط Binding sites وكذلك على البعد بين موقع ارتباط واخر Primer distance.

ويتم تفريق القطع المتضاعفة في هلام الاكاروز وان وجود او عدم وجود هذه الحزم ينتج من التباينات بين الافراد والتي يكون سببها اما الطفرات الوراثية منها الحذف Deletion او الادخال Insertion او اعادة الترتيب Rearrangement او اعادة التوليف Recombination.

من مميزات هذه البادئات:-

- لا تتطلب معرفة مسبقة لتتابعات الــDNA الجينومي.
- بادئات عامة Universal يمكن ان تعمل على جينوم أي كائن حي .
- تتطلب تراكيز قليلة من الــDNA من 25- 50 نانوغرام.
- لا تتطلب استخلاص الــDNA بنقاوة عالية.
- تحتاج الى عدد من البادئات لغرض اجراء المقارنة الاحصائية للعينات.
- درجة الحرارة المستخدمة للالتئام تكون واطئة تتراوح ما بين (30-40 م°) كونها عشوائية وتتطلب وقت كافي لإيجاد التسلسل المتمم لها.
- يتم تطبيقها للتفريق بين الانواع مثل هناك بادئات تستخدم للتفريق بين الاجناس وبادئات تستخدم للتفريق بين الانواع وبادئات تستخدم للتفريق بين السلالات ايضا.
- واسعة الاستخدام واصبح من الممكن تطبيقها على مدى واسع من الكائنات الحية كالإنسان والحيوان وايضا اصبح بالإمكان تطبيقها للتميز بين الأنواع التابعة لنفس الجنس من الخميرة *Saccharomyces* وايضا الفطر *Aspergillus* وايضا بين نوعين من البعوض الناقل للملاريا.

<u>تحليل نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)</u>

ان الاختلاف في المادة الوراثية (DNA) والتي يمكن الحصول عليها من تطبيق المؤشرات اعلاه يمكن اعتمادها لتحديد البعد الوراثي بين الانواع والاصناف المختلفة وكالاتي:-

- يتم تحويل النتائج التي ظهرت في الهلام الى جداول التوصيف وذلك بوضع رقم 1 عند وجود الحزمة و0 عند غيابها. ولغرض إيجاد العلاقة الوراثية بين الانواع المنتخبة يتم تحويل بيانات التوصيف الى قيم التشابه المقدرة باستخدام الحاسوب ضمن برنامج خاص والذي يعتمد على معادلة Li و Nei:-

Similarity=2nxy/nx+ny

- تقدير النسبة المئوية للبعد الوراثي (Genetic distance) بين الانواع او الاصناف والتي تعتمد على نتائج التشابه الوراثي وفقا للمعادلة الاتية:-

Genetic distance=1-(2nxy/nx+ny)100

حيث ان nxy: تمثل عدد الحزم المشتركة بين النموذجين x و y

nx: عدد الحزم الكلية في النموذج x، ny: عدد الحزم الكلية في النموذج y.

- رسم مخطط التحليل التجميعي Dendogram الذي يوضح العلاقات الوراثية بين الانواع والذي يعتمد قيم الابعاد الوراثية التي يتم الحصول عليها من الخطوة السابقة وذلك وفقا لطريقة UPGMA cluster analysis حيث يتم ادخال القيم في حاسوب الالي ضمن برنامج (NTSYS-PC) وبالتالي الحصول على مخطط التحليل التجميعي الذي يوضح المجاميع الوراثية القريبة والبعيدة من بعضها البعض.



صورة هلام الاكاروز باستخدام المؤشر OPI-14 الخاصة بمؤشرات الــ RAPD

2. البادئات المتخصصة Species –specific

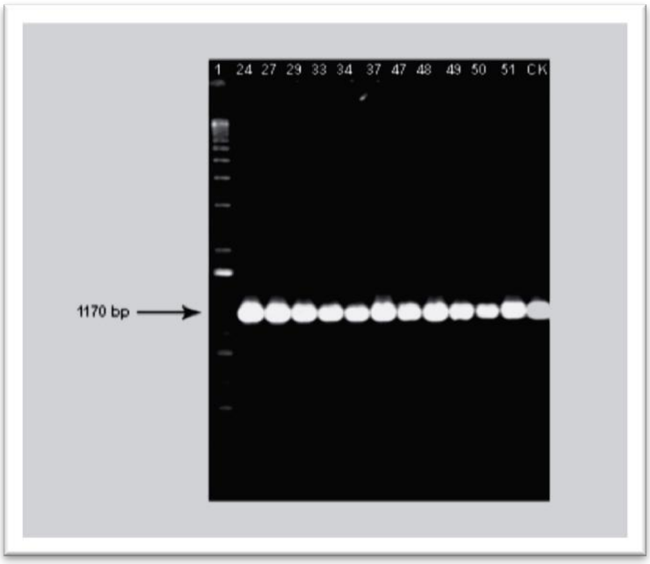
مؤشرات التي تستخدم فيها تتابعات متخصصة كمواقع محددة متوزعة داخل الجينوم كالــAlu-PCR ومؤشرات التتابعات القصيرة المتكررة Simple sequence repeat مثال على ذلك استخدام بادئات

SC1: 5'-AACGGTGAGAGATTTCTGTGC-3'
SC2: 5'AGCTGGCAGTATTCCCACAG-3'

هذه البادئات مختصة لتضاعف موقع معين من الجينوم في rDNA في خميرة الخبز .

من مميزات هذه البادئات:

- يتطلب عزل الــDNA بنقاوة عالية.
- يتطلب درجات حرارة عالية للالتئام حوالي من 55–68 م°.
- استخدام بادئات امامية وخلفية في التفاعل.



صورة هلام الاكاروز باستخدام مؤشر species –specific

<u>انواع تقنية الــ PCR:–</u>

- **PCR العادي :–**

وهو ما تم شرحه والتطرق اليه في الخطوات السابقة .

- **الــ PCR الكمي Real-Time الاشعاعي المتفلور**

وهذا النوع يقوم على نفس المبدأ ولكن الخلاف الوحيد يكون الجهاز مرتبط بكمبيوتر لتحديد الوقت الحقيقي لبدا التفاعل ومن ثم الكمية الحقيقية لعدد نسخ الحمض النووي (DNA) ويعتمد ذلك على وجود قواعد نيتروجينية حرة مشعة لتحديد ذلك . مما يسهل على

الباحثين الوقت لتحدد وجود الجين المطلوب أو لا ، وكمية الجين بدون الوصول إلى نهاية الدورات الحرارية المحددة . يمكن ان يتم التحليل بعد تفاعل الــPCR باستخدام SYBR green chemistry . من مميزات هذه الطريقة كونها طريق دقيقة للكشف عن مستويات سلاسل الــDNA والــ RNA النوعي في العينات النسيجية بالرسم البياني للزيادة في الفلورة التي تقابل عدد الدورات فان النظام يعطي مخطط تضخيم يزودنا بصورة كاملة عن عملية الــPCR بشكل اكبر من الصورة المعطاة من تحليل الناتج المتراكم بعد عدد ثابت من الدورات فهي تعتمد على الكشف عن الاشارة الاشعاعية الصادرة التي تتناسب مع تضخيم الــPCR وان زمن الحصول على البيانات وتحليها قصير جدا تم تصميمه واعداده في البداية لأغراض بحثية وقد اصبحت تستخدم للتشخيص كما انها تتصف بالتكرارية والانتاجية العالية وقلة احتمال التلوث.

- **الــPCR النسخ العكسي RT-PCR**

في بعض تطبيقات الــPCR لا يكون القالب DNA بل قد يكون الــRNA من امثلة تحاليل الــPCR التي تجري لتشخيص اصابات فيروسية حيث تكون المادة الوراثية للفيروس هي RNA مثل فيروس HIV (فيروس نقص المناعة المكتسب) FMDV (الفيروسات المسببة لأمراض الفم والقدم) وبما ان الــRNA لا يمكن ان تقوم بدور السلسلة القالب في الــ PCR لذلك يتم ادخال انزيم النسخ العكسي للــPCR ليقوم بقلب الــRNA الى cDNA باستخدام تفاعلات انزيمية بسيطة بواسـطة Reverse transcriptase والــcDNA الناتج يتم تضخيمه، وتستخدم هذه الطريقة في تشخيص الامراض ولا سيما الامراض المعدية.

- **الــNested PCR:-**

طريقة محورة من تفاعل البلمرة المتسلسل وضفت هذه الطريقة لزيادة الحساسية والتخصصية في النتائج المستحصلة عليها من تفاعل البلمرة المتسلسل على سبيل المثال يتم تصميم بادئات لغرض تضخيم تسلسلات متخصصة لجزيئة الــDNA فاحتمال انتاج بلايين النسخ من قطعة منفردة بسرعة عالية في بعض الاحيان ممكن ان يكون هناك خطا ما قد حصل اثناء التضخيم لذلك يعقبه تفاعل بلمرة ثاني يستخدم فيه نواتج تضاعف التفاعل الاول ويكون ناتج التضخيم الثاني اقصر من الاول، فعلى سبيل المثال يتم في هذه العملية نوعين متتالين من الــPCR كل منها يتضمن دورة تضخيم يحوي الــ PCR الاول زوج من البادئات للتحري عن جين مثلا يقوم الزوج الاول تضخيم بطول 424 زوج قاعدة في تفاعل سلسلة البلمرة الاول. ويقوم الزوج الثاني بتضخيم قطعة 199 زوج قاعدة في تفاعل البلمرة الثاني ضمن القطعة المضخمة في التفاعل الاول حيث يستخدم

نواتج تضخيم تفاعل سلسلة البلمرة الاولى بوصفها قالبا لتفاعل سلسلة البلمرة الثانية. الهدف من الطريقة للتأكد من النتائج.

- **الــ Restriction fragment length polymorphism – PCR (RFLP - PCR)**

ان تقنية تباين اطوال قطع التقييد هي احدى مؤشرات الــDNA المبنية على اساس تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل لسلسلة الــDNA والتي نحصل من خلالها على حزمة متضاعفة خاصة بنوع البادئ المصمم على جين معين من جينات الكائن الحي وبعدها يجري عملية هضم لهذه الحزمة باستخدام الانزيمات القاطعة نحصل على حزم ذات اطوال مختلفة نستطيع من خلالها تمييز بين بعض الحيوانات لاسيما ذات صلة القرابة من بعضها وايضا بين الخمائر والبكتريا التابعين لنفس الجنس ذات صلة القرابة من بعضها والتي لا يمكن تميزها الا باستخدام الانزيمات القاطعة وايضا يستخدم في الطب العدلي للكشف عن القاتل.

- **الــPCR المتعدد Multiplex PCR**

في هذا النوع من تفاعل البلمرة المتسلسل يتم تضخيم متزامن للعديد من الجينات المعنية في تفاعل واحد باستخدام اكثر من زوج من البادئات حيث تم اكتشافه من قبل Chamberlain سنة 1988. تستخدم هذه الطريقة للكشف عن العديد من العوامل او السلالات الممرضة في ان واحد وايضا للكشف عن الطفرات وتباين الاشكال وفي التحليلات الكمية وفي تفاعل البلمرة المتسلسل ذات النسخ العكسي ومبدا عمله هو التحليل التشخيصي الذي يسمح بالكشف المتزامن عن عاملين ممرضين او اكثر. يعد فعالا اكثر ومختصر للوقت والكلفة في حال لو اجرينا الاختبارات للكشف عن كل عامل ممرض على حدة ولكن يتطلب وقت طويل ومرهقة في بعض الاحيان من اجل تحديد الظروف المثلى في تضخيم الجينات ومن معايير انتقاء البوادىء ان يكون لها نفس Tm في كل المواقع ويشير الــPCR المتعدد هو PCR تفريقي حيث يضخم الجين الهدف في انبوب تفاعل مفرد.

تباين اطوال قطع التقييد Restriction fragment length polymorphism

نوع اخر من المؤشرات الوراثية والتي لها تأثيرا معتبرا ضمن مجال تشخيص وعلاج الامراض وتعرف على انها توارث الاختلاف في مواقع القطع الانزيمي الذي يتسبب في ظهور اطوال مختلفة من قطع الــDNA على هلام الاكاروز عند هضم الــ DNA باستخدام احد انواع الانزيمات القاطعة و ان منهجية الــRFLP تعتمد على الاختلافات

في طرز التقطيع الذي يحدث بسبب طفرة نيكليوتيدية واحدة عن موقع القطع او بواسطة القطع المضافة او المحذوفة او المستبدلة عن تلك المواقع مما يؤدي الى تباين اطوال القطع الناتجة.

تطبيقات RFLP

- تستخدم هذه التقنية في الكشف عن الطفرات وخاصة الطفرات المعروفة ، حيث سمحت هذه التقنية برسم خارطة الجينات عدة في مواقعها الكروموسومية ومن الامثلة على ذلك الجينات المسؤولة عن امراض وراثية في الانسان مثل مرض هينتجنون وهو مرض وراثي عصبي يصيب الانسان (خلل في الكروموسوم الرابع) ، التليف الكيسي (الكروموسوم السابع)، فقر الدم المنجلي(الكروموسوم الثالث عشر)، الزهايمر (الكروموسوم الحادي والعشرين).
- تسمح هذه التقنية في الكشف عن المشبوهين في الحالات التي يتم الحصول على نماذج من الدم او المني او اللعاب.
- تستطيع التقنية الحصول على دليل قاطع للعلاقات العائلية في حالة وجود جدل على الاصل او المنشأ او الابوة ، لان نموذج الحزمة للشخص المعني تكون موروثة (مشتقة من الكروموسومات الابوية والامية). ولهذا ستحتوي البصمة الوراثية للطفل حزمة نظيرة لبصمات الاب والام، ويمكن استخدام التقنية مع كائنات حية اخرى مثل القطط والكلاب والطيور والابقار والنباتات والفطريات الى اخره.

يتضمن العمل في هذه التقنية ثلاث مراحل:-

اولا: **استخلاص الــDNA**: من العينات مثلا استخلاصها من الدم او اللعاب او المني او غيرها من النماذج الاحيائية المتوفرة.

ثانيا: **توليد قطع التقييد:** يهضم الــDNA المنقى باستخدام الأنزيمات القاطعة.

على سبيل المثال نلاحظ نمط التسلسل النيوكليوتيدي **GCGC** حيث يتكرر هذا التسلسل اكثر من مرة في الــDNA المجيني وعدد مرات تكرارها هو نمط فريد لكل كائن فان الانزيم القاطع سوف يقطع الــDNA اينما يتكرر هذا النمط

↓ ↓ ↓

Person1: 5′GCGCATGTTGCGCAAGAGCGC3′

Person2: 5′GCGCATGAAGGCAATGACGC3′

↑ ↑

الشخص الاول له تسلسلات متكررة ثلاث مرات بينما الشخص الثاني متكرر مرتين لذلك فان الانزيم القاطع سيقطع جزيئة الــDNA بين كل اول قاعدة نايتروجينية G واول قاعدة نايتروجينية C لذلك فان:-

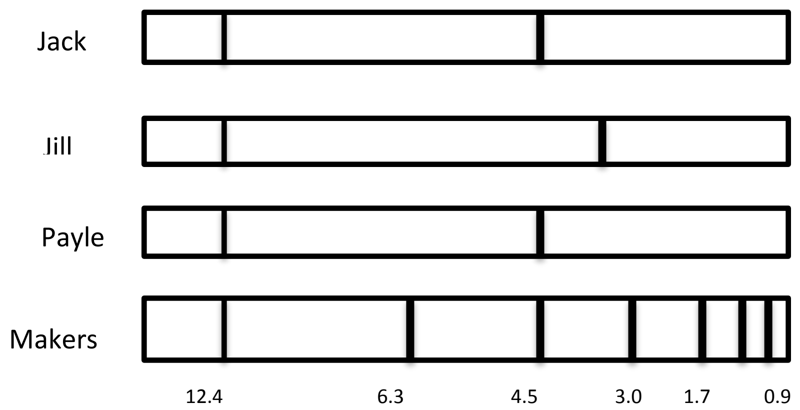
Person1-2largefragmen:5′G….CGCATGTTG….CGCAAGAG…..CGC3′
Person2- 1 large fragment 5′G…..CGCATGAAGGCAATGAG…CGC3′

ثالثا: الترحيل الكهربائي : ان قطع الــDNA المتولدة تمتلك شحنة سالبة لذلك يمكن فصلها باستخدام الترحيل الكهربائي والتي تفصل الــDNA بالاعتماد على الحجم.

مثال على استخدام تقنية الــRFLP في تحديد الابوة:-

لتحديد هل ان Jack هو والد الطفل Payle ؟

في هذه القضية سوف يتم عزل الــDNA من كريات الدم البيض لثلاث اشخاص Jack و Jill و Payle وبعد ذلك يطبق عليه تقنية الــ RFLP والنتائج موضحة ادناه:



في هذه الحالة واضح ان Jack هو والد الطفل Payle لان Payle ورث قطعة DNA حجمه 12.4 kb من Jill وقطعة DNA حجمها 4.3kb من Jack.

في قضية اخرى عندما يكون Jack ليس والد الطفل Payle ستظهر حزم الــDNA بشكل اخر يلاحظ ان Payle له قطعة الــDNA حجمها حوالي 6kb مقارنة بقطعة الــDNA التي يمتلكها Jack والتي حجمها 4.3 kb.

